

Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України*Гризодуб О.І., Леонтьєв Д.А., Чікалова С.О., Верушкин О.Г., Георгієвський В.П.*Стандартизована процедура валідації
кількісних методик титрування лікарських засобів 5**До видання Доповнення 3 до Державної Фармакопеї України***Котова Е.Е., Тихоненко Н.І., Котов А.Г., Груненко Я.А., Вовк О.Г., Тихоненко Т.М.*Питання введення до Державної Фармакопеї України
монографії «Чебрець повзучий» 30

Проект монографії «Чебрець повзучий» 36

Проблеми. Пошук. Рішення.*Меркулова Ю.В. Чайка Л.О., Гомон О.М.*Роль рН та його корекція при випробуванні
деяких лікарських засобів на бактеріальні ендотоксини 39**Фітохімічні дослідження***Попова Н.В., Литвиненко В.И.*

Вопросы стандартизации лекарственного растительного сырья — мелиссы листьев 45

Черкашина А.В., Ковалев С.В.

Аминокислотный и минеральный состав травы нута обыкновенного 50

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

Дослідження ліпофільних фракцій трави та підземних органів медуни темної 53

Готові лікарські засоби*Ярних Т.Г., Руденко М.В.*Обґрунтування складу лікарського препарату
для ветеринарної медицини «Антисепт ОксиТ» 55*Єрещенко О.А., Стрельников Л.С., Кабачний Г.І., Стрілець О.П.*Мікробіологічне обґрунтування використання
комплексного бактеріофага при розробці пінного препарату
в аерозольній упаковці для лікування гнійно-запальних захворювань 60**Екстемпоральні лікарські засоби***Євтіфєєва О.А., Георгіяц В.А., Савченко Л.П.*Вивчення однорідності маси простих порошоків, виготовлених
в умовах аптеки, на відповідність вимогам Державної Фармакопеї України 64

-
- 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 № 5 від 26.05.09.
 - Підписано до друку 25.06.09. Тираж 500 прим.
-

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості*Бовтенко В.О., Безугла О.П., Ляпунов М.О., Стопер Ю.М.*

Валідація методик аналізу препарату «Беклометазон інгаляція під тиском» 78

Георгієвський Г.В., Куліков А.Ю.

Визначення домішок у вітчизняних субстанціях —

похідних 1,2,4-триазолу — методом обернено-фазової ВЕРХ 87

Погайний Д.Г., Мерзлікін С.І., Блажеєвський М.Є.

Спектрофотометричне визначення діакамфу

та метформіну у антидіабетичному засобі 98

Фармакологічні дослідження*Крамаренко О.О.*

Порівняльна оцінка фармакологічної дії вітчизняного

препарату Апротинін 200000 КІО та препарату Гордокс 100000 КІО 104

Єсєва О.А., Штриголь С.Ю., Мерзлікін С.І.

Церебропротекторні властивості нового протидіабетичного засобу діакамфу 110

Соколюк Т.В., Горбенко Н.І., Погайний Д.Г., Мерзлікін С.І.

Дослідження антигіперглікемічних та антиатерогенних властивостей

діакамфу на кролях за умов експериментального цукрового діабету 2 типу 114

Харченко Д.С., Зупанець І.А., Шебеко С.К.

Дослідження впливу кверцетину

при парентеральному введенні на біохімічні показники щурів

із нирковою недостатністю на тлі хронічного гломерулонефриту 117

Корнієнко В.І., Самура Б.А., Літаров В.Є.

Дослідження антиноцицептивної

та антифлогістичної активності амонійних солей

заміщених імідазо-[1,2-*f*]ксантиніл-8-оцтової кислоти 121**Організація діяльності фармацевтичних підприємств***Дьякова Л.Ю., Немченко А.С., Носенко О.А.*

Управління внутрішнім навчанням і розвитком персоналу аптечних закладів в умовах

впровадження належних практик (GDP і GPP) 125

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Гризогуб А.И., Леонтьев Д.А., Чикалова С.О., Верушкин А.Г., Георгиевский В.П.

Стандартизованная процедура валидации
количественных методик титрования лекарственных средств 5

К изданию Дополнения 3 к Государственной Фармакопее Украины

Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Груненко Я.А., Котов А.Г., Вовк А.Г., Тихоненко Т.М.

Вопросы введения в ГФУ монографии «Чабрец ползучий» 30

Проект монографии «Чабрец ползучий» 36

Проблемы. Поиск. Решения.

Меркулова Ю.В., Чайка Л.А., Гомон О.Н.

Роль рН и его коррекция при испытании некоторых
лекарственных средств на бактериальные эндотоксины 39

Фитохимические исследования

Попова Н.В., Литвиненко В.И.

Вопросы стандартизации лекарственного
растительного сырья — Melissa officinalis 45

Черкашина А.В., Ковалев С.В.

Аминокислотный и минеральный состав травы нута обыкновенного 50

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

Исследование липофильных фракций травы
и подземных органов медуницы темной 53

Готовые лекарственные средства

Ярных Т.Г., Руденко М.В.

Обоснование состава лекарственного препарата
для ветеринарной медицины «Антисепт ОксигТ» 55

Ерещенко О.А., Стрельников А.С., Кабачний Г.И., Стрилец О.П.

Микробиологическое обоснование использования
комплексного бактериофага при разработке пенного препарата
в аэрозольной упаковке для лечения гнойно-воспалительных заболеваний 60

Экстемпоральные лекарственные средства

Евтифеева О.А., Георгиянц В.А., Савченко Л.П.

Изучение однородности массы простых порошков,
приготовленных в аптечных условиях, на соответствие
требованиям Государственной Фармакопеи Украины 64

Стандартизация лекарственных средств и валидаия методик контроля качества

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

Валидация методик анализа препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением» 78

Георгиевский Г.В., Куликов А.Ю.

Определение примесей в отечественных субстанциях —
производных 1,2,4-триазола — методом обращенно-фазовой ВЭЖХ 87

Подгайный Д.Г., Мерзликін С.И., Блажеевский Н.Е.

Спектрофотометрическое определение диакамфа
и метформина в антидиабетическом средстве 98

Фармакологические исследования*Крамаренко Е.А.*

Сравнительная оценка фармакологического действия отечественного препарата Апротинин 200000 КИЕ и препарата Гордокс 100000 КИЕ..... 104

Есева О.А., Штрыголь С.Ю., Мерзликин С.И.

Церебропротекторные свойства нового противодиабетического средства диакамфа 110

Соколюк Т.В., Горбенко Н.И., Подгайный Д.Г., Мерзликин С.И.

Исследование антигипергликемических и антиатерогенных свойств диакамфа на кролях в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа 114

Харченко Д.С., Зупанец И.А., Шебеко С.К.

Изучение влияния кверцетина при парентеральном введении на биохимические показатели крыс с почечной недостаточностью на фоне хронического гломерулонефрита..... 117

Корниенко В.И., Самура Б.А., Литаров В.Е.

Исследование антиноцицептивной и антифлогистической активности аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантиниал-8-уксусной кислоты 121

Организация деятельности фармацевтических предприятий*Дьякова Л.Ю., Немченко А.С., Носенко А.А.*

Управление внутренним обучением и развитием персонала аптечных учреждений в условиях внедрения надлежащих практик (GDP и GPP) 125

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.07

Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Чикалова С.О., Верушкин А.Г., Георгиевский В.П.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств

Проведено систематическое обсуждение факторов, влияющих на погрешности методик количественного титрования лекарственных средств, а также подхода Европейской Фармакопеи к валидации методик количественного титрования и показаны его недостатки. Предложена обоснованная стандартизованная процедура проведения валидации методик количественного титрования, которая апробирована на примере методики количественного определения субстанции таурина.

В Дополнение 2 к Государственной Фармакопее Украины (ГФУ-2008) [1] введены методические рекомендации по проведению валидации аналитических методик контроля качества лекарственных средств (ЛС) (глава D). Аналогичные рекомендации в виде Руководства [2] действуют и в Российской Федерации. Данные рекомендации (и связанные с ними критерии) основаны на научных разработках Фармакопейного центра [3-6] и хорошо зарекомендовали себя для главных фармакопейных сравнительных методов — хроматографии и спектрофотометрии.

Однако применение их к такому важному и, казалось бы, простому фармакопейному прямому методу количественного определения, как титриметрия, наталкивается на определенные трудности, связанные с большим разнообразием факторов, влияющих на точность титриметрических методик. Данный вопрос изучался для условий аптек и контрольных лабораторий [7]. Однако проблема валидации титриметрического анализа настолько обширна, что охватить все вопросы сразу вряд ли возможно. Кроме того, условия выполнения титриметрического анализа и, соответственно, принципы проведения его валидации, на фармацевтических предприятиях существенно отличаются от условий аптек.

Целью данной работы является систематическое рассмотрение данных вопросов для лабораторий фармацевтических предприятий и связанных с ними государственных контрольных лабораторий, с целью разработки стандартизованной процедуры валидации титриметрических методик. Обсуждение проводится для методик прямого кислотно-основного титрования, однако полученные выводы в значительной степени применимы и к другим титриметрическим методикам, а также для обратного титрования.

1. Фармакопейные требования к валидации количественных аналитических методик

Валидация аналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения поставленных задач [1].

Для методик количественного определения необходимо контролировать: правильность, сходимость, специфичность (недостаток специфичности испытания может компенсироваться другими дополнительными испытаниями), линейность, диапазон применения [1]. Отметим, что диапазон применения методики (и, соответственно, диапазон, в котором проверяется линейность) составляет, если нет других указаний, (80-120) % от номинального значения [1].

1.1. Область применения и допуски содержания

Титриметрия в фармакопейном анализе — это основной прямой метод количественного определения субстанций [8].

Стандартные допуски содержания — (99.0-101.0) % (например, *Оксазепам*), однако можно привести примеры субстанций с допусками содержания (99.5-100.5) % (*Кислота лимонная безводная*), (99.0-100.5) % (*Кетопрофен*), (98.5-100.5) % (*Индометацин*), (98.5-101.0) % (*Артикаина гидрохлорид*), (98.5-101.5) % (*Кофеин*) и (98.0-102.0) % (*Нифедипин*) (Табл. 1) [8].

В некоторых специальных случаях титрование в ГФУ применяется для количественного определения комплексных субстанций, например, *Теофиллин-этилендиамин* с допусками содержания теофиллина (84.0-87.4) % и этилендиамина (13.5-15.0) % [8].

В ГФУ описано также применение титрования и для количественного определения готовых лекарственных средств (ГЛС) [8]. Допуски содержания составляют при этом обычно (95.0-

105.0) % от номинального содержания (например, *Борной кислоты раствор спиртовый, Йода раствор спиртовый, Салициловой кислоты раствор спиртовый*) [8].

1.2. Общие требования к неопределенности методик титрования

Общее выражение для расчета содержания анализируемого методом титрования вещества в испытуемой пробе, в процентах, имеет вид:

$$X = K_T \cdot T \cdot \frac{(V - V_0)}{m} \cdot 100\% \quad (1)$$

где:

K_T — поправочный коэффициент к титру,

V — общий объем, израсходованный на титрование, в миллилитрах,

V_0 — объем, израсходованный на титрование холостого опыта, в миллилитрах,

T — количество анализируемого вещества, соответствующее 1 мл титранта номинальной концентрации,

m — навеска анализируемого вещества, в граммах.

В том случае, когда титрование проводят без холостого опыта, в выражении (1) полагают $V_0 = 0$. В случае потенциометрического титрования объем титрования обычно находится как разность между двумя скачками потенциала [8, 23], т.е. сразу находится величина $(V - V_0)$, поэтому здесь также можно считать $V_0 = 0$.

Следует отметить, что стратегическое направление титриметрических методик в ЕФ (и, соответственно, в ГФУ) — полный отказ от индикаторного титрования и переход на потенциометрическое титрование. Уже сейчас для титрования субстанции индикаторное титрование в ЕФ и ГФУ используется достаточно редко [8, 23]. Это связано как с некоторой субъективностью индикаторного титрования, так и с простотой использования при потенциометрии обратного титрования (позволяющего оттитровывать гидрохлориды лекарственных оснований) и определения объема титрования по разности между двумя скачками потенциалов.

В общем случае, относительную неопределенность методики титрования (как и любой другой методики анализа) Δ_{As} можно представить в виде суммы двух составляющих, выступающих при проведении титрования испытуемого образца как систематическая Δ_S и случайная Δ_R неопределенности [9]:

$$\Delta_{As}^2 = \Delta_S^2 + \Delta_R^2 \quad (2)$$

Случайная составляющая Δ_R определяется неопределенностью титрования непосредственно испытуемого раствора: неопределенностью

объемов титрования испытуемого раствора (включая и неопределенность определения точки эквивалентности) и сходимостью взятия навески испытуемого образца. Систематическая составляющая Δ_S связана с неопределенностью величин, являющихся постоянными при титровании испытуемого раствора (хотя, возможно, и случайными по отношению друг к другу). Это поправочный коэффициент к номинальной концентрации титранта (K), объем холостого опыта (V_0) и правильность взятия навески при установке титра. Относительная неопределенность поправочного коэффициента равна относительной неопределенности концентрации титранта.

В соответствии с ГФУ [1], предельно допустимая неопределенность методик количественного определения $\max \Delta_{As}$ определяется из соотношений:

Субстанции:

$$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = B_H - 100\% \quad (3)$$

ГЛС:

$$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = \frac{B_H - B_L}{2} \cdot 0.32 \quad (4)$$

Здесь B_H и B_L — соответственно, верхний и нижний допуски содержания основного вещества в анализируемой пробе по действующей аналитической нормативной документации или монографии ГФУ.

В общем случае, рекомендуется, чтобы систематическая составляющая неопределенности Δ_S была незначимой по сравнению с максимально допустимой неопределенностью всей аналитической методики $\max \Delta_{As}$, т.е., в соответствии с принципом незначимости [1, 10], должно выполняться соотношение:

$$\Delta_S \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} \quad (5)$$

В этом случае систематическая составляющая значимо не влияет на принятие решений о качестве и может не учитываться при выставлении требований к сходимости параллельных титрований анализируемого образца. В противном случае такой учет необходим.

2. Неопределенность конечной аналитической операции титрования

2.1. Неопределенность взвешивания

В соответствии с требованиями ГФУ [1], основанных на Руководстве Европейской Фармакопеи [11], неопределенность взвешивания не должна превышать 0.2 мг. Однако, неясно, какая неопределенность имеется при этом в виду — систематическая, случайная или полная.

Методическая Инструкция ХГНИИМ [12] четко различает пределы допускаемой погрешности (т.е. полной неопределенности взвешивания) и единичное среднеквадратическое отклонение (СКО) для 10 параллельных взвешиваний (которое характеризует случайную составляющую неопределенности взвешивания). Различие между ними составляет обычно 3-5 раз [12].

Если полная неопределенность взвешивания не превосходит доверительный интервал случайной составляющей, то это означает, что Инструкция не предполагает значимой систематической погрешности взвешивания. Это важно с практической точки зрения, поскольку случайную составляющую неопределенности можно уменьшить увеличением числа параллельных навесок, а систематическую — нельзя [9].

Доверительный интервал для единичного измерения равен произведению коэффициента Стьюдента для соответствующей вероятности и числа степеней свободы на СКО [9]. Этот коэффициент Стьюдента и характеризует статистически незначимое различие между СКО и пределами допускаемой погрешности. В аналитической практике обычно используется вероятность 0.95 (или 95 %). Рассчитаем коэффициент Стьюдента для единичного взвешивания с вероятностью 0.95.

В соответствии с Инструкцией ХГНИИМ [12], СКО определяется для 10 параллельных взвешиваний (т.е. $\nu = 9$ степеней свободы). Пределы допускаемой погрешности нагруженных весов при этом определяются по результатам этих же

10 взвешиваний во всем диапазоне взвешивания. Каждое единичное взвешивание не должно превышать регламентированных значений. Если считать, что это требование должно выполняться для всех 10 взвешиваний с вероятностью 0.95, то соответствующая вероятность для единичного взвешивания равна [9]:

$$0.95^{(1/10)} = 0.99488.$$

Соответствующий коэффициент Стьюдента для данной вероятности и 9 степеней свободы равен $t(0.99488, 9) = 3.24$ [9]. Если провести все эти расчеты для исходной вероятности не 0.95, а 0.99, то получим $t(0.998995, 9) = 4.29$.

Таким образом, мы не можем говорить о наличии систематической погрешности, если различие между СКО единичного взвешивания и пределом его допустимой погрешности не превышает 3.24 (с вероятностью 0.95) или 4.29 (с вероятностью 0.99). Учитывая, что это различие регламентируется обычно в пределах 3-5 [12], можно сделать вывод, что Инструкция не предполагает наличие у весов значимой систематической погрешности. Таким образом, при проведении титрования *неопределенность взвешивания можно уменьшить увеличением числа параллельных навесок.*

Верхний предел допускаемого СКО для аналитических весов регламентируется обычно величиной 0.1 мг [12]. Учитывая, что коэффициент Стьюдента для вероятности 0.95 и 9 степеней свободы равен 1.83, получим, что доверительный интервал единичного взвешивания с вероятностью 0.95 не превосходит величины $\max \Delta_m = 0.18$, т.е. точность единичного взвешивания

Таблица 1

Характеристики методик кислотно-основного титрования некоторых субстанций в зависимости от допусков содержания основного вещества [8]

Допуски содержания, %	$\max \Delta_{As} \% [1]$	$\max \Delta_s \% [1]$	Наименование субстанции	Навеска для анализа m , г	$\max \Delta_m * \%$	Номинальный объем титрования $V_{ном}$, мл	% объема бюретки 10 мл
99.0-101.0	1.0	0.32	оксазепам	0.25	0.080	8.72	87.2
99.5-100.5	0.5	0.16	кислота лимонная	0.55	0.036	8.59	85.9
99.0-100.5	0.5	0.16	кетопрофен	0.20	0.100	7.86	78.6
98.5-100.5	0.5	0.16	индометацин	0.30	0.067	8.38	83.8
98.5-101.0	1.0	0.32	артикаина гидрохлорид	0.25	0.080	7.79	77.9
98.5-101.5	1.5	0.48	кофеин	0.17	0.118	8.75	87.5
98.0-102.0	2.0	0.64	фенирамина малеат	0.13	0.154	7.51	75.1
<i>Среднее</i>						8.23	82.3

Примечание.

* — рассчитано исходя из требований ГФУ $\max \Delta_m = 0.2$ мг.

на таких весах (с СКО ≤ 0.1 мг) удовлетворяет требованиям Фармакопеи (≤ 0.2 мг) [1, 11].

Обобщенная информация по титриметрическим методикам количественного определения некоторых субстанций представлена в Табл. 1.

Для титриметрического количественного определения субстанций в ГФУ используют обычно навески выше 200 мг (Табл. 1), что отвечает $\max\Delta_m \leq 0.1$ %. Эта величина даже для допусков содержания (99.5-100.5)% не превосходит максимально допустимой величины систематической погрешности (0.16 %) из уравнения (5). Учитывая, что на практике для проведения титриметрического количественного определения используется не менее 3 навесок, получим, что *неопределенность, вносимая взвешиванием, не является значимой при количественном титриметрическом определении субстанций.*

Отметим, что для ГЛС допуски содержания, как уже говорилось выше, составляют в ГФУ (95-105)%, что, в соответствии с уравнениями (4-5), дает $\max\Delta_{As} = 1.6$ %, $\max\Delta_S = 0.5$ %.

2.2. Неопределенность доставляемого объема бюретки

В соответствии с требованиями ГФУ [1, 8], при количественном определении должна использоваться мерная посуда класса А [13-15], требования к которой гармонизованы с требованиями ГОСТ [16-18] к посуде 1 класса. В соответствии с этими требованиями бюретки бывают двух типов.

Тип 1: без установленного времени ожидания класса А и В (ISO); для окончательной уста-

новки мениска время слива жидкости со стенок бюретки не устанавливаются.

Тип 2: с установленным временем ожидания — только класса А (ISO), с четким указанием на маркировке времени ожидания (например, $E_x + 30$ s). По стандарту ISO для бюреток класса А время слива жидкости со стенок для окончательной установки мениска составляет 30 с.

Погрешности сливаемой жидкости бюретки не должны превышать указанных ниже значений (Табл. 2) [13-18]. Пределы допускаемых погрешностей означают максимально допускаемые погрешности в любой точке шкалы и погрешности разностей между двумя любыми точками шкалы. В Табл. 2 приведены требования для бюреток класса А, для сравнения приведены также требования и для бюреток класса В (класса 2 по ГОСТ [16-18]). Приведены также взятые из Табл. 1 требования к максимально допустимой величине систематической погрешности $\max\Delta_S$ в зависимости от максимально допустимой неопределенности аналитической методики $\max\Delta_{As}$.

Возникает закономерный вопрос: указанные в Табл. 2 максимально допустимые погрешности имеют систематический или случайный характер? Учитывая, что данные максимально допустимые погрешности регламентируются для разности объемов между двумя любыми делениями шкалы (в частности, между нулем и любым другим делением бюретки) [16-18], можно предположить, что для разных выливаемых объемов (например, 2 мл, 3 мл, 6 мл и т.д.) эти погрешности могут иметь разный знак, т.е. носить случайный характер. В этом случае

Таблица 2

Допустимые отклонения от номинального объема бюреток

Номинальная вместимость, мл	Цена наименьшего деления, мл	Пределы погрешности ($\max \Delta_{bur}$)					
		Класс А			Класс В		
		\pm мл	%	% на 80% объема бюретки	\pm мл	%	% на 80% объема бюретки
1	0.01	0.01	1	1.25	0.02	2.0	2.50
2	0.01	0.01	0.5	0.625	0.02	1.0	1.25
5	0.02	0.01	0.2	0.25	0.02	0.4	0.50
10	0.02	0.02	0.2	0.25	0.05	0.5	0.625
	0.05	0.02	0.2	0.25	0.05	0.5	0.625
25	0.05	0.03	0.12	0.15	0.05	0.2	0.25
	0.1	0.05	0.2	0.25	0.1	0.4	0.50
50	0.1	0.05	0.1	0.125	0.1	0.2	0.25
100	0.2	0.1	0.1	0.125	0.2	0.2	0.25
<i>максимально допустимые значения систематической погрешности $\max\Delta_S$</i>							
$\max\Delta_{As} = 0.5$ %				$\max\Delta_S = 0.16$ %			
$\max\Delta_{As} = 1.0$ %				$\max\Delta_S = 0.32$ %			
$\max\Delta_{As} = 1.5$ %				$\max\Delta_S = 0.48$ %			
$\max\Delta_{As} = 2.0$ %				$\max\Delta_S = 0.64$ %			

данная неопределенность будет уменьшаться (как $1/\sqrt{n}$) при увеличении числа (n) параллельных титрований (поскольку объемы при этом будут разные). Если же данные максимально допустимые погрешности носят систематический характер (т.е. имеют одинаковый знак для разных объемов), данные погрешности не могут быть уменьшены увеличением числа параллельных титрований, что необходимо учитывать при прогнозе суммарной неопределенности методики количественного определения методом титрования.

2.2.1. Контроль предельных погрешностей бюретки

Следует отметить, что контроль предельных погрешностей (Табл. 2) может производиться разными способами. В отечественных ГОСТ [16-18], соответствующих международным стандартам ISO [13-15], а также в общем стандарте ISO на лабораторную посуду [19], процедуры контроля этих погрешностей с необходимыми критериями (аналогичной процедуре для весов [12]) не приведены. В [16] указано лишь, что их необходимо контролировать по «документации, утвержденной в установленном порядке». Такие процедуры описаны в литературе.

Например, объем бюретки разбивается на 5 частей и для каждой из них должны выдерживаться требования Табл. 2 [20]. Для этого соответствующий доставляемый объем воды взвешивается, а полученная масса пересчитывается на объем с учетом табличной плотности воды при данной температуре [19]. Процедуру повторяют, полученные результаты разностей фактического и номинального объемов усредняют и округляют с точностью до 0.01 мл и полученные после округления результаты сравнивают с требованиями Табл. 2. Для получения точного доставляемого объема рекомендуется использовать увеличительное стекло [20].

Типичный пример такого расчета приведен в Табл. 3 [20].

Нетрудно видеть, что для проверки бюретки в данном случае применяется «подтверждающий подход» [10], т.е. предполагается, что в «промежуточных объемах» бюретки (тех, которые не охватываются калибровкой) требования Табл. 2 выполняются, если они выполняются для исследованных объемов. Подтверждающий подход является в данном случае оправданным, если при производстве бюреток используется система обеспечения качества.

Однако, при применении на практике методики [20] возникают вопросы. В частности, сколько раз надо повторять процедуру? Что является критерием достаточности числа повторных определений? При проведении калибровки бюретки мы имеем дело с двумя типами погрешностей. Одна из них является погрешностью объемов самой бюретки Δ_{bur} (которую мы и хотим проверить) и определяется как разность между найденным экспериментально объемом и номинальным. Вторая (Δ_{oper}) является случайной погрешностью определения доставляемого объема оператором и определяется как доверительный интервал параллельных определений объема. Исходя из принципа незначимости [1, 10], величина Δ_{oper} значимо не влияет на оценку погрешности объема бюретки, если выполняется соотношение:

$$\Delta_{oper} \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{bur} \tag{6}$$

Здесь: $\max \Delta_{bur}$ — максимально допустимое (по ГОСТ [1-18]) отклонение фактического объема бюретки от номинального значения. В частности, для бюреток класса А вместимостью 25 мл с ценой наименьшего деления 0.1 мл $\max \Delta_{bur} = 0.05$ мл (Табл. 2). В этом случае неопределенность (полуширина доверительного интервала среднего значения объема), связанная с работой оператора, не должна превышать $\Delta_{oper} = 0.016$

Таблица 3

Результаты исследования фактического объема бюретки класса А вместимостью 25 мл с ценой наименьшего деления 0.1 мл ($t = 23$ °С, 1 г воды = 1.0035 мл) [20]

Считываемый объем, мл	Масса колбы с вылитым объемом, мл	Масса вылитой воды, г	Истинный объем, мл	Поправка к считываемому объему, мл (≤ 0.05 мл)
0.02*	41.153	0.000	0.00	0.00
5.01	46.160	5.007	5.02	+0.03*
10.00	51.136	9.983	10.02	+0.04
15.03	56.125	14.972	15.02	+0.01
20.01	61.096	19.943	20.01	+0.02
24.98	66.023	24.870	24.96	0.00

Примечание.

* — начальный считываемый объем не равен нулю и должен поэтому вычитаться из последующих считываемых объемов

мл. Аналогично, для бюретки вместимостью 10 мл получим $\Delta_{oper} \leq 0.0064$ мл. Только в этом случае можно делать вывод о качестве бюретки по доставляемому объему. В противном случае число параллельных определений объема надо увеличить. Для расчета величины Δ_{oper} целесообразно использовать объединенное по всем 5 объемам бюретки абсолютное стандартное отклонение параллельных взвешиваний (SD_{pool}) [9]. Отметим, что примерно такие же требования и предъявляет Руководство [20]: расхождения между параллельными определениями поправки к истинному объему бюретки вместимостью 25 мл не должны превышать 0.03 мл.

Если положить, что проводится по 5 параллельных взвешиваний для каждого объема бюретки, то можно рассчитать, какому генеральному абсолютному стандартному отклонению (SD_{oper}) доставляемого объема (погрешность оператора) для бюреток вместимостью 10 мл и 25 мл соответствует неравенство (6):

Номинальный объем бюретки 10 мл

$$SD_{oper} \leq \frac{0.0064 \cdot \sqrt{5}}{1.64} = 0.0087 \text{ ml.} \quad (7)$$

Номинальный объем бюретки 25 мл

$$SD_{oper} \leq \frac{0.016 \cdot \sqrt{5}}{1.64} = 0.022 \text{ ml.}$$

Данные величины SD_{oper} соответствуют относительному стандартному отклонению $RSD_{oper} = 0.087\%$ на полный объем обеих бюреток. Интересно отметить, что эта величина практически совпадает с относительным стандартным отклонением из 30 параллельных взвешиваний ($RSD = 0.082\%$) при определении полного объема пипетки вместимостью 10 мл опытным аналитиком [21]. Таким образом, можно сделать вывод, что требования (7) соответствуют обычной аналитической практике. Следует отметить, что поверка (квалификация) бюретки требует достаточно высокой квалификации оператора. В противном случае получаемые величины RSD могут на порядок превышать критерии приемлемости (7) [21].

Методика [20] предназначена для калибровки и поверки бюретки для последующего применения ее в общем случае — для любого титриметрического анализа. Ее следует отличать от процедуры квалификации бюретки для целей фармакопейного анализа, поскольку квалификация аналитического оборудования — это экспериментальное подтверждение того, что оно (в данном случае бюретка) способно обеспечить выполнение анализа с необходимой точностью. Поскольку максимально допустимая погреш-

ность бюретки $max \Delta_{bur}$ регламентируется в мл (Табл. 2), то чем больше доставляемый объем относительно полного объема бюретки, тем меньше его относительная неопределенность. Так, для бюретки класса А вместимостью 10 мл (стандартная бюретка для фармакопейного анализа) $max \Delta_{bur} = 0.02$ мл. Для доставляемого объема 2 мл это соответствует относительной максимальной погрешности 1.0 %, а для полного объема 10 мл — 0.2 %. Поэтому в фармакопейном анализе номинальный доставляемый объем обычно выбирается в пределах (70-90) % от полного объема бюретки (Табл. 1).

В Табл. 1 субстанции для соответствующих допусков содержания взяты случайным образом, поэтому полученные средние значения V_{nom} и процента объема бюретки имеют лишь информационный характер. Однако они достаточно точно отражают подход Европейской Фармакопеи (ЕФ) [8] и, соответственно, ГФУ [8] к методикам титрования — номинальный доставляемый объем должен составлять около $(80 \pm 10)\%$ бюретки, используемой для титрования.

Процедура контроля предельных погрешностей бюретки вызывает много вопросов и требует поэтому отдельного рассмотрения. В то же время, важным выводом из Табл. 3 является то, что отклонения от номинального объема бюретки имеют одинаковый знак, т.е. носят систематический характер (наши собственные исследования также подтверждают это). Таким образом, в общем случае, гарантируемая ГОСТ [16-18] *предельно допустимая погрешность бюретки не может быть уменьшена увеличением числа параллельных определений и должна рассматриваться как систематическая при прогнозе погрешности.*

2.2.2. Поправки к номинальному объему бюретки

Одним из дискуссионных моментов является возможность введения поправок к номинальному объему бюреток, полученных при их калибровке (Табл. 3) [20]. Это позволило бы существенно уменьшить погрешность их фактического объема. Данный подход, вполне применимый в научных исследованиях, однако, не представляется возможным использовать при рутинном фармакопейном контроле качества лекарственных средств, поскольку порождает больше проблем, чем решает. Во-первых, в этом случае становится совершенно ненужным требование ГФУ [1, 8] об обязательном использовании при количественном анализе мерной посуды класса А — ведь все равно вводится поправка к номинальному объему. Во-вторых,

«подтверждающий подход» [10] в этом случае не применим, и поправку необходимо вводить для *каждого* деления бюретки (возможность экстраполяции нужно доказать). Для бюретки вместимостью 10 мл с ценой деления 0.02 мл это 500 поправок. Таким образом, аналитик выполняет работу производителя бюреток. В-третьих, совершенно неясно, какова точность этих поправок, и как они могут меняться во времени. Кроме того, процедуру такой калибровки необходимо валидировать (как?). Имеются и другие возражения, но и так ясно, что гораздо надежнее и корректнее опираться на максимальные погрешности ГОСТ [16-18].

Из Табл. 2 и вывода о невозможности уменьшить систематическую погрешность бюретки за счет увеличения числа параллельных титрований следует также важный практический вывод: бюретки вместимостью 1 мл и 2 мл не пригодны для фармакопейного титриметрического анализа субстанций, поскольку вносимая ими систематическая погрешность превышает предельные значения $\max\Delta_s$ для любых допусков содержания.

3. Титрованные растворы

3.1. Требования к неопределенности концентрации титранта

Для титрования используют титрованные растворы, неопределенность в концентрации (молярности) которых выступает при титровании испытуемых образцов как систематическая погрешность $\Delta(\text{titr})$, которая не должна превышать предельного значения $\max\Delta_s$ из уравнения (5) и Табл. 1, т.е.

$$\Delta(\text{titr}) = \Delta_s \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (8)$$

В этом случае она значимо не влияет на принятие решений о качестве. В противном случае фактическую величину $\Delta(\text{titr})$ необходимо учитывать при выставлении требований к неопределенности конечной аналитической операции — титрования анализируемого образца. Какие же требования выставляет ЕФ (и, соответственно, ГФУ) к неопределенности концентрации титранта?

Как указано в ГФУ [8] и ЕФ 3.0 [22], концентрация титрованных растворов не должна отличаться от номинальной более чем на 10 % относительных и должна определяться с точностью 0.2 % относительных. Слабым местом данной формулировки является то, что неопределенность концентрации титранта никак не связана с решаемой задачей. Как видно из Табл. 1, для максимально допустимой неопределенности анализа $\max\Delta_{As} = 0.5\%$ требования к неопреде-

ленности титра $\Delta(\text{titr}) \leq 0.2\%$ являются недостаточными (надо $\leq 0.16\%$), а для $\max\Delta_{As} = 2.0\%$ — избыточными (надо $\leq 0.64\%$). Вывод очевиден: неопределенность титра должна быть увязана с решаемой задачей.

Возможно, поэтому позиция ЕФ к неопределенности титра изменилась. Так, в ЕФ 6.0 [23] в разделе 4.2.2 указано: «Для определения молярности используют *необходимое количество параллельных титрований*. Сходимость не должна превышать 0.2 % относительных (относительное стандартное отклонение)».

Смысл данной формулировки состоит в том, что определение титра должно проводиться со сходимостью параллельных титрований, характерной для обычной аналитической практики титрования сильных кислот и оснований, для которых вполне достижимо относительное стандартное отклонение $RSD = 0.2\%$. Необходимый же доверительный интервал этой сходимости регулируется числом параллельных титрований и определяется самим пользователем, исходя из требований решаемой задачи.

Как видим, формулировка ЕФ 6.0 ($RSD \leq 0.2\%$) является, вроде бы, более корректной, чем формулировка ГФУ [8] и ЕФ 3.0 [22] ($\Delta(\text{titr}) \leq 0.2\%$), поскольку неопределенность титра привязана к решаемой задаче.

Однако формулировка ЕФ 6.0, в отличие от ГФУ-2001 и ЕФ 3.0, регламентирует лишь *сходимость повторных титрований* при определении концентрации титранта. В то же время, суммарная неопределенность титра включает в себя и другие составляющие, в частности: неопределенность взятия навески вещества для установления титра (это важно, если эта навеска слишком мала), температурный фактор (различие температур при установлении титра и собственно титровании анализируемого образца), неопределенность доставляемого объема бюретки и др. Данные факторы могут быть в некоторых случаях очень существенными. Однако контроль их ЕФ оставляет на усмотрение пользователя, концентрируясь только на сходимости параллельных титрований, т.е. случайной части полной неопределенности титра. Данный подход представляется недостаточно корректным.

Какую же минимальную гарантированную неопределенность можно получить для концентрации титрованных растворов? Рассмотрим влияние основных факторов — температуры и неопределенности бюретки.

3.2. Влияние температуры

В соответствии с требованиями ГФУ [8], гармонизованными с ЕФ [23], температура в поме-

пении может изменяться в пределах (15-25) °С, т.е. на 10 °С. Соответствующее этому изменение объема изменяется от 0.19 % для водных титрантов до 1.24 % для метанольных (Табл. 4). На основе теплового расширения рассчитаны полная систематическая ($\Delta_S(titr)$ %) и полная ($\Delta(titr)$ %) неопределенности концентрации титранта (см. далее). Для сравнения в Табл. 4 приведены также требования (5) и Табл. 1 к максимальной величине систематической погрешности $max\Delta_S$ для различных значений полной максимальной неопределенности анализа $max\Delta_{As}$ для различных наиболее часто используемых фармакопейных растворителей.

Как видно из Табл. 4, влияние температуры на неопределенность концентрации титрованных неводных растворов очень значительно. Даже для водных титрантов это влияние для максимального температурного диапазона 10 °С (0.19 %) является значимым для предельной неопределенности аналитической методики $max\Delta_{As} = 0.5$ %. Для неводных же титрантов это влияние в 5-6 раз больше. Отметим, что ГФУ [8] (и ЕФ [23]) для титрованных растворов хлорной кислоты в уксусной кислоте требует учета точной разницы температур при установлении титра и при собственно титровании анализируемого образца [8]. В то же время, для других неводных титрантов таких указаний, к сожалению, нет.

Однако в условиях отечественных контрольно-аналитических лабораторий провести учет температуры не всегда возможно. Если температура воздуха в лаборатории утром была 15 °С, а через 1 час стала 20 °С (включили кондиционер), то это еще не означает, что температура титранта тоже стала 20 °С. Скорее всего, она будет мало отличаться от 15 °С, поскольку на нагрев титрованного раствора нужно время, а теплоемкость воздуха мала. Таким образом, установить корректно температурную поправку в таких условиях не всегда возможно.

Одним из очевидных выходов из данного положения является более жесткая регламентация температуры воздуха помещений для титриметрии, особенно для неводного титрования. Из Табл. 4 видно, что регламентация температуры в пределах 2 °С позволяет нивелировать влияние температуры для всех титрантов при максимально допустимой неопределенности анализа $max\Delta_{As} = 1.0$ % и более. При максимально допустимой неопределенности анализа $max\Delta_{As} = 0.5$ % надежнее использовать только водные титранты. Отметим, что в ГФУ [8] и ЕФ [23] именно так и поступают.

Другим подходом является использование метода стандарта - определение титра и титрование испытуемого образца из одной и той же бюретки в одно и то же время.

Таблица 4

Тепловое расширение и полная систематическая неопределенность для различных титрантов

Растворитель	Примеры фармакопейных титрантов	Тепловое расширение [24]		$\Delta_S(titr)$ %		$\Delta(titr)$ %	
		$\Delta_{therm}, \%$		10 °С	2 °С	10 °С	2 °С
Разница температур при определении титра и при анализе (Δt)		10 °С	2 °С	10 °С	2 °С	10 °С	2 °С
вода	НCl, NaOH, йод	0.19	0.04	0.25	0.16	0.30	0.23
метанол	метилаты Na и Li	1.24	0.25	1.25	0.29	1.26	0.34
этанол	КОН, NaOH, НCl	0.82	0.16	0.83	0.23	0.85	0.28
н-пропанол	тетрабутиламмония гидроксид	0.94	0.19	0.96	0.25	0.97	0.30
бензол		1.22	0.24	1.23	0.29	1.24	0.33
этилбензол		0.95	0.19	0.96	0.25	0.98	0.30
толуол*	ТБАГ в метанол-толуоле	1.08	0.22	1.09	0.27	1.11	0.31
муравьиная кислота		1.01	0.20	1.02	0.26	1.04	0.31
уксусная кислота	хлорная кислота	1.05	0.21	1.07	0.26	1.08	0.31
хлороформ		1.25	0.25	1.26	0.30	1.27	0.34
<i>Максимально допустимые значения систематической погрешности Δ_S</i>							
$max\Delta_{As} = 0.5$ %		$max\Delta_S = 0.16$ %					
$max\Delta_{As} = 1.0$ %		$max\Delta_S = 0.32$ %					
$max\Delta_{As} = 1.5$ %		$max\Delta_S = 0.48$ %					
$max\Delta_{As} = 2.0$ %		$max\Delta_S = 0.64$ %					

Примечание.

* — интерполяция по бензолу и этилбензолу [24]

3.3. Влияние различий в бюретках при определении титра и проведении анализа

Из Табл. 5 видно, что для определения титра обычно используют бюретки вместимостью 25 мл, а для проведения титрования субстанций — 10 мл (Табл. 1). Это вызвано стремлением уменьшить неопределенность определения титра, поскольку бюретка вместимостью 25 мл имеет меньшую гарантируемую ГОСТ неопределенность (0.12 % на полный объем для цены деления 0.05 мл), чем бюретка вместимостью 10 мл (0.20 % на полный объем) (Табл. 2). Однако использование разных бюреток для определения титра и собственно титрования существенно увеличивает систематическую неопределенность титра — в нее включается и неопределенность (Δ_{bur}) обеих бюреток.

3.4. Полная неопределенность концентрации титранта

Выражение для полной неопределенности концентрации титранта $\Delta(titr)$, по аналогии с уравнением (2), можно записать в виде:

$$\Delta^2(titr) = \Delta_S^2(titr) + \Delta_R^2(titr). \quad (9)$$

Случайная составляющая $\Delta_R(titr)$ представляет собой сходимость результатов при определении титра и может быть уменьшена увеличением числа параллельных титрований. Для оценки ее можно использовать требования ЕФ — относительное стандартное отклонение сходимости при определении титра не должно превышать 0.2 % [23], т.е. $RSD_{rep} \leq 0.2\%$. Поскольку для определения RSD_{rep} должно использоваться

не менее 6 повторностей ($n \geq 6$) [11], то, рассматривая $\Delta_R(titr)$ как односторонний доверительный интервал (для вероятности 95 %) среднего значения, получим [1]:

$$\Delta_R(titr) \leq \frac{2.015 \cdot 0.2}{\sqrt{6}} = 0.16\%. \quad (10)$$

Систематическая (неустраняемая) составляющая $\Delta_S(titr)$ не может быть уменьшена увеличением числа параллельных титрований при определении титра и связана, прежде всего, с изменением объема за счет разницы температур при определении титра и титровании образцов (Δ_{therm}), а также с неопределенностью объема бюретки по ГОСТ [16-18] (Δ_{bur}) (другие составляющие гораздо менее значимы, и ими можно пренебречь). Данные две составляющие, являясь постоянными при проведении анализа образцов, являются случайными по отношению друг к другу. Поэтому полную систематическую неопределенность титра $\Delta_S(titr)$ можно представить в виде [1]:

$$\Delta_S^2(titr) = \Delta_{therm}^2 + \Delta_{bur}^2. \quad (11)$$

Отметим, что при определении титра номинальный объем составляет не 80 % (как при титровании субстанций — Табл. 1), а около 75 % (Табл. 5). Поэтому относительная неопределенность бюретки вместимостью 25 мл при определении титра равна $\Delta_{bur} = 0.12 \cdot 100 / 75 = 0.16\%$. Учитывая это и тепловое расширение различных растворителей, по уравнению (11) можно рассчитать величину $\Delta_S(titr)$, которая представлена в Табл. 4.

Таблица 5

Характеристики методик определения молярности некоторых титрованных растворов [8]

Номинальная молярность	Наименование титранта, растворитель	Навеска или объем для определения молярности	$max\Delta_m\%$ ($max\Delta_m = 0.2$ мг [1, 11])	Номинальный объем титрования $V_{ном}$, мл	% объема бюретки емкостью 25 мл
1.0	азотная кислота, вода	1.00 г Na_2CO_3	0.020	18.9	75.5
1.0	хлористоводородная кислота, вода	1.00 г Na_2CO_3	0.020	18.9	75.5
1.0	натрия гидроксид, вода	20 мл титранта титруют 1 М HCl		20	80
0.5	серная кислота, вода	1.00 г Na_2CO_3	0.020	18.9	75.5
0.1	хлористоводородная кислота, вода	0.10 г Na_2CO_3	0.200	18.9	75.5
0.1	хлорная кислота, уксусная кислота	0.35 г, калия гидрофталат	0.057	17.1	68.6
0.1	натрия гидроксид, вода	20 мл титранта титруют 0.1 М HCl		20	80
0.050	йод, вода	0.080 г As_2O_3	0.250	16.2	64.7
0.020	натрия эдетат, вода	0.100 г цинка	0.200	19.1	76.5
Среднее				18.7	74.6

Используя соотношения (9-11), можно рассчитать и полную неопределенности концентрации титрованного раствора $\Delta(\text{titr})$, которая должна удовлетворять требованиям (8). Величины $\Delta(\text{titr})$ для разных титрантов приведены в Табл. 4.

3.5. Влияние величины навески и чистоты исходных стандартных веществ

Для титрованных растворов существует еще один источник неопределенности — чистота исходных стандартных веществ (первичных стандартов). Содержание основного вещества в них ГФУ обычно не регламентирует [8]. Предполагается, что оно равно 100 %, что, вряд ли, всегда корректно. Только для цинка ГФУ регламентирует содержание основного вещества не менее 99.9 %, т.е. неопределенность содержания не более 0.1 %. По-видимому, на это значение и надо опираться для остальных веществ. Как видно, это значение (0.1 %) не превосходит $\text{max}\Delta_S$ для любых допусков содержания (Табл. 4).

Кроме содержания основного вещества, одним из возможных факторов является наличие остаточной воды. В частности, одни из самых распространенных исходных стандартных веществ — натрия карбонат и калия гидрофталат (Табл. 5) — перед использованием сушат до постоянной массы [8]. Постоянная масса — это когда различие масс при двух последовательных взвешиваниях не отличается более чем на 0.5 мг [8]. Это означает, что если для высушивания берется масса исходного стандартного вещества более 1 г, то неопределенность содержания воды не превосходит 0.05 %, что не превосходит $\text{max}\Delta_S$ для любых допусков содержания (Табл. 4).

Незначимой является и влияние величины навески стандартных веществ при установлении титра для допусков содержания (99.0-101.0) % и шире. Учитывая, что титр определяется по результатам k повторностей, величины

$\text{max}\Delta_m$, приведенные в Табл. 5, будут еще в \sqrt{k} раз меньше.

3.6. Вторичная стандартизация титранта

Более существенным является влияние вторичной стандартизации. Так, одни из самых распространенных титрантов — 1 М и 0.1 М растворы натрия гидроксида стандартизируются по, соответственно, 1 М и 0.1 М растворам кислоты хлористоводородной [8], т.е. является вторичным титрантом. При этом 20 мл соответствующего раствора натрия гидроксида титруют соответствующим раствором кислоты хлористоводородной.

В соответствии с требованиями ISO и гармонизованного с ним ГОСТ [25], неопределенность пипетки с одной меткой класса А вместимостью 20 мл (а именно такие пипетки и следует использовать) не должна превышать $\Delta_{20} = 0.15\%$. Эта величина не превосходит $\text{max}\Delta_S$ для любых допусков содержания (Табл. 4). Отметим, что использование пипеток с одной меткой класса В или градуированных пипеток класса А увеличивает неопределенность, соответственно, до 0.3 % и 0.5 % [25] и делает ее значимой (Табл. 4). Неопределенность взятия аликвоты (Δ_{20}) не может быть уменьшена увеличением числа повторностей и выступает в неопределенности титра как систематическая погрешность.

При проведении вторичной стандартизации полная неопределенность концентрации титранта, по которому проводится стандартизация, выступает как систематическая погрешность $\Delta(\text{titr}, 1)$. Систематической погрешностью является и неопределенность пипетки вместимостью 20 мл (Δ_{20}). Соответственно, выражения (11) для систематической погрешности и полной неопределенности (9) в случае вторичной стандартизации принимают вид:

$$\Delta_S^2(\text{titr}, 2) = \Delta^2(\text{titr}, 1) + \Delta_{\text{therm}}^2 + \Delta_{\text{bur}}^2 + \Delta_{20}^2. \quad (12)$$

Таблица 6

Сравнение неопределенностей концентрации титрантов при первичной и вторичной стандартизациях

Разница температур при определении титра и при анализе (Δt) →	$\Delta_S(\text{titr})\%$		$\Delta(\text{titr})\%$	
	10°C	2°C	10°C	2°C
первичная стандартизация — 0.1 М и 1 М растворы HCl	0.25	0.16	0.30	0.23
вторичная стандартизация - 0.1 М и 1 М растворы NaOH	0.42	0.32	0.45	0.36
Максимально допустимые значения систематической погрешности Δ_S				
$\text{max}\Delta_{A_S} = 0.5\%$	$\text{max}\Delta_S = 0.16\%$			
$\text{max}\Delta_{A_S} = 1.0\%$	$\text{max}\Delta_S = 0.32\%$			
$\text{max}\Delta_{A_S} = 1.5\%$	$\text{max}\Delta_S = 0.48\%$			
$\text{max}\Delta_{A_S} = 2.0\%$	$\text{max}\Delta_S = 0.64\%$			

$$\Delta^2(\text{titr}, 2) = \Delta_S^2(\text{titr}, 2) + \Delta_R^2(\text{titr}). \quad (13)$$

Уравнения (10, 12, 13), а также Табл. 5, позволяют оценить неопределенность титра при вторичной стандартизации. Такая оценка проведена в Табл. 6 для 0.1 М раствора натрия гидроксида. Для сравнения приведены соответствующие значения для 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной (первичная стандартизация) и максимально допустимые значения систематической погрешности для разных предельных значений полной неопределенности аналитической методики.

В целом, при вторичной стандартизации полная неопределенность титра $\Delta(\text{titr})$ примерно в 1.5 раза выше, чем при первичной стандартизации. При этом, она практически полностью определяется систематической погрешностью $\Delta_S(\text{titr})$, т.е. не может быть уменьшена за счет увеличения числа повторных титрований при вторичной стандартизации. Следует отметить, что неопределенность титра не зависит в данном случае от его концентрации, поскольку слагаемые уравнений (12-13) не зависят от концентрации.

Из Табл. 6 видно, что полная неопределенность титра 0.1 М и 1 М растворов натрия гидроксида является значимой при максимально допустимой величине неопределенности 0.5 % и 1.0 % при регламентации температуры как ± 5 ($\Delta t = 10^\circ\text{C}$), так и ± 1 ($\Delta t = 2^\circ\text{C}$). В то же время, 1 М и 0.1 М растворы натрия гидроксида применяются для количественного определения кислоты лимонной с допусками содержания (99.5-100.5) % ($\text{max}\Delta_{As} = 0.5\%$) и большого количества субстанций с $\text{max}\Delta_{As} = 0.5\text{-}1.0\%$ (Табл. 1 и [8]). Такой анализ вряд ли можно считать всегда метрологически корректным. Поэтому корректнее определять концентрацию титрованных растворов натрия гидроксида как первичного стандарта - по калия гидрофталату.

4. Влияние холостого опыта

В общем выражение (1) для расчета содержания анализируемого методом титрования вещества в испытуемой пробе входит величина V_0 — объем холостого опыта. Как уже отмечалось выше, объем холостого опыта является важным при индикаторном титровании (где он присутствует всегда), поскольку при потенциометрическом титровании объем титрования обычно находится как разность между двумя скачками потенциала.

Наличие холостого объема связано с разными факторами.

Первый фактор - титрование самого индикатора, различные кислотно-основные фор-

мы которого имеют разный цвет. Иногда на титрование индикатора могут расходоваться значительные объемы титранта. Так, количественное определение 1 % спиртового раствора кислоты салициловой проводится титрованием 0.1 М раствором натрия гидроксида в присутствии 0.5 мл раствора фенолфталеина Р1, представляющего собой 10 мг/мл раствор фенолфталеина (М.м. = 318.3 у.е.) в 96 % спирте [8]. Нетрудно видеть, что на титрование 0.5 мл раствора фенолфталеина Р1 должно израсходоваться $(0.5 \cdot 10 / 318.3) / 0.1 = 0.16$ мл 0.1 М раствора натрия гидроксида, что составляет 2.2 % от номинального объема титрования (7.2 мл). Учитывая допуски содержания ($\pm 5\%$), влияние индикатора в данном случае очень значительно. Обычно оно, как минимум, на порядок ниже — за счет использования более разведенного раствора индикатора (в частности, раствора фенолфталеина Р — 1 мг/мл), уменьшением его объема (до (0.05-0.10) мл) и увеличения концентрации титранта (до, например, 1 М) [8]. Данный расчет, однако, показывает, что оценку влияния титрования самого индикатора всегда надо делать.

Второй фактор - кислотно-основные примеси в растворителе. Так, в случае основных растворителей (например, диметилформамида) всегда приходится считаться с кислотностью, вызванной поглощением углекислоты воздуха.

При индикаторном титровании возможны два варианта учета объема холостого опыта:

1. Нейтрализация растворителя по индикатору с последующим растворением анализируемого вещества и титрованием по уже добавленному индикатору. Нейтрализацию можно проводить двумя способами. Первый (обычный) — к стандартному объему растворителя, взятого для титрования испытуемой навески, добавляют индикатор и нейтрализуют. При этом неопределенность объема холостого опыта переходит в разряд случайных неопределенностей и, следовательно, может быть уменьшена увеличением числа повторностей. Данный способ характерен для ЕФ [23] и связанной с ней ГФУ [8]. Второй способ состоит в нейтрализации большого объема растворителя (чтобы уменьшить неопределенность титрования) с последующим отбором стандартного объема для титрования данной навески. При этом неопределенность объема холостого опыта остается систематической погрешностью. Данный подход, вообще говоря, менее корректный, особенно для основных растворителей, поскольку не учитывает возможное поглощение углекислоты воздуха.

2. Параллельно титрованию испытуемого раствора (объем V) проводится титрование холостого опыта, объем которого (V_0) затем вычитается из объема титрования испытуемого раствора (V) — формула (1). Неопределенность холостого опыта при этом выступает как постоянная составляющая.

Первый вариант наиболее приближен к потенциометрическому титрованию и является более объективным, чем второй вариант. Это связано с тем, что объем холостого опыта (V_0) обычно мал (десятые и сотые доли миллилитра), и при индикаторном титровании его трудно точно определить из-за субъективного фактора. При использовании первого варианта субъективный фактор значительно меньше. В то же время, неопределенность объема холостого опыта и в этом варианте также оказывает влияние на результаты анализа (она просто включается в величину $V - V_0$, которая экспериментально определяется в варианте 1).

5. Метод стандарта

Метод сравнительного титрования (стандарта) заключается в параллельном титровании из одной и той же бюретки титрантом исходного стандартного вещества (с целью определения титра) и испытуемого раствора. Навеска исходного стандартного вещества подбирается таким образом, чтобы она соответствовала номинальному объему титрования. Количество повторностей для определения титра и титрования испытуемого раствора одинаково, что подчеркивает равноценность их вкладов в суммарную неопределенность методики. *В таком варианте проведение титрования, фактически, ничем формально не отличается от проведения спектрофотометрического или хроматографического анализа методом стандарта* [8].

Нетрудно видеть, что в методе стандарта (как и в спектрофотометрии и хроматографии) нивелируются основные систематические погрешности: неопределенность бюретки (Табл. 2) и температурный фактор (Табл. 4). Нивелируется и влияние холостого опыта. Остальные факторы, в значительной степени, переходят в случайные погрешности, которые можно уменьшить увеличением числа повторных титрований.

Возникает вопрос, а почему же тогда Фармакопея [8, 11, 23] не использует метод стандарта в титровании? Основным недостатком метода стандарта является то, что титр в нем должен определяться заново при титровании каждого нового образца. В случае государственного контроля (который обычно является единоразовым) и научных исследований это не вызы-

вает каких-либо трудностей. Однако при рутинном контроле на предприятиях (когда изо дня в день титруются разные серии одного и того же образца с прослеживаемостью анализа) применение метода стандарта существенно удлинит анализ. При этом обычный фармакопейный подход (описанный выше) имеет свои преимущества. Для лаборатории госконтроля можно порекомендовать разработать соответствующий СОП, где обосновать использование метода стандарта.

6. Общие выводы по неопределенности методик титрования

1. Как видно из Табл. 4, температуру нужно обязательно регламентировать в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$ ($\Delta t = 2^\circ\text{C}$). Только в этом случае полная неопределенность концентрации титранта $\Delta_S(\text{titr})$ может соответствовать требованиям соотношения (8). При колебаниях температуры $\pm 5^\circ\text{C}$ ($\Delta t = 10^\circ\text{C}$) возможно использование только водных титрантов и только при $\max\Delta_{A_S} \geq 1.0\%$.

2. Основной составляющей неопределенности титра для неводных титрантов является тепловое расширение, а для водных титрантов при регламентации температуры в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$ — еще и систематическая неопределенность бюретки.

3. Вторичная стандартизация существенно увеличивает неопределенность титра и делает ее значимой для предельной неопределенности анализа 0.5 % и 1.0 %. Метрологическая корректность методики количественного титриметрического определения с использованием такого вторичного титранта для максимально допустимой неопределенности методики $\max\Delta_{A_S} = 0.5\%$ вызывает большие сомнения.

4. В целом, *добиться суммарной неопределенности титра в пределах 0.2 %, как указано в ГФУ [8], при рутинном анализе просто нереально*, хотя фактическая (но неизвестная) погрешность титра может быть и меньше.

5. Систематическая неопределенность титрования может быть незначимой по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью аналитической методики $\max\Delta_{A_S}$ по каждому из многочисленных факторов, однако добиться ее незначимости по совокупности всех этих факторов очень трудно.

6. В то же время, титриметрические методики отличаются обычно высокой сходимостью результатов, т.е. неопределенность конечной аналитической операции мала по сравнению с допустимой неопределенностью анализа $\max\Delta_{A_S}$. Поэтому принцип незначимости систематической погрешности, который успешно при-

менялся при валидации хроматографических и спектрофотометрических методик анализа [1-6], в случае титриметрических методик не является эффективным, поскольку может быть реализован достаточно редко. Здесь нужны другие подходы, один из которых предлагает Европейская Фармакопея (ЕФ) [11].

7. Подход Европейской Фармакопеи к валидации титриметрических методик

Главный принцип, который реализует ЕФ в своем *Руководстве* [11] для титриметрических методик количественного определения состоит в том, что основную часть суммарной неопределенности методики составляет именно систематическая погрешность, которую в принципе невозможно исключить. Этот подход в корне отличается от принципа незначимости систематической погрешности, общепринятого в аналитической практике и который успешно применялся при валидации хроматографических и спектрофотометрических методик анализа [1-6].

Подход ЕФ заключается в следующем.

Рекомендуется проводить титрование в условиях аналитической нормативной документации (АНД) не менее 7 образцов в случайном порядке с точкой эквивалентности в диапазоне от 20 % до 90 % объема бюретки.

Относительная погрешность считывания массы на весах и объема конечной точки титрования должна быть менее 0.5 % относительных.

Методом наименьших квадратов получают линейную зависимость:

$$V_i = a_{obs} + b_{obs} \cdot m_i, \quad (14)$$

где: V_i — объем титрования (в мл) навески массой m_i (в мг) (в пересчете на сухое вещество — в Техническом Руководстве ЕФ [11] это упущено). Для оценки полученных метрологических характеристик прямой применяют следующие критерии.

Критерий 1 — пропорциональная систематическая погрешность (отклонение). Наклон полученной прямой b_{obs} , с учетом концентрации титранта, должен отличаться от теоретического значения b_{theor} не более чем на 0.3 % для потенциометрического титрования и не более чем на 0.5 % для индикаторного, т.е.

Потенциометрическое титрование

$$100 \cdot \left| \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \leq 0.3\%. \quad (15a)$$

Индикаторное титрование

$$100 \cdot \left| \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \leq 0.5\%. \quad (15b)$$

$$b_{theor} = \frac{Z}{M_r \cdot C_r}, \quad (16)$$

где:

M_r — относительная молекулярная масса анализируемого вещества,

Z — стехиометрический коэффициент реакции титрования,

C_r — молярность титранта.

Критерий 2 — дополнительная систематическая погрешность (отклонение). Отрезок, отсекаемый на оси ординат a_{obs} должен удовлетворять требованиям:

Потенциометрическое титрование

$$100 \cdot \left| \frac{a_{obs}}{V_T} \right| \leq 0.4\%. \quad (17a)$$

Индикаторное титрование

$$100 \cdot \left| \frac{a_{obs}}{V_T} \right| \leq 0.6\%, \quad (17b)$$

где: V_T — номинальный объем титрования.

Критерий 3 — точность (статистическая погрешность). Остаточное стандартное отклонение $sdv(V)$ точек вокруг прямой (14) [9] должно удовлетворять соотношению:

Потенциометрическое титрование

$$100 \cdot \frac{sdv(V)}{V_T} \leq 0.3\%. \quad (18a)$$

Индикаторное титрование

$$100 \cdot \frac{sdv(V)}{V_T} \leq 0.5\%. \quad (18b)$$

Критерий 4 — практическая относительная погрешность. Для некоторых методик титрования могут не выполняться *Критерии 1* и *2*, но точность их для номинального объема (8 мл \pm 1 мл для бюретки вместимостью 10 мл), может быть вполне приемлемой. В этом случае вычисляют правильность линейной регрессии для номинального объема титрования по формуле:

$$\delta_{RL} = \left| \frac{a_{obs}}{V_T} + \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \cdot 100\%. \quad (19)$$

Величина δ_{RL} не должна превосходить значений δ , приведенных в Табл. 7.

В том случае, когда методика хорошо обоснована, достаточно просто проверить, что ее сходимость (относительное стандартное отклонение $RSD_{rep} \%$ [9]) и правильность (δ) для не менее 6 параллельных титрований удовлетворяют требованиям Табл. 7. Правильность при этом рассчитывают обычным способом [9]:

$$\delta = \left| \frac{x - x_{theor}}{x_{theor}} \right| \cdot 100\%. \quad (20)$$

8. Обсуждение подхода Европейской Фармакопеи

Изложенный выше подход ЕФ [11] к валидации титриметрических методик, несмотря на свою простоту и кажущуюся логичность, не отвечает общим требованиям, предъявляемым к валидации аналитических методик, описанных в этом же самом Руководстве [11] (и, соответственно, в ГФУ [1]).

Валидация — это экспериментальное подтверждение того, что методика пригодна для решения поставленных задач [1, 11]. Задача — количественное определение лекарственных средств методом титриметрии. Из этого вытекают и необходимые критерии.

8.1. Диапазон применения

Валидация методики проводится в рамках диапазона ее применения. Для количественного определения субстанций и лекарственных форм диапазон применения должен быть не уже (80-120) % от номинального содержания [1]. Учитывая, что номинальный объем титрования бюретки вместимостью 10 мл (а именно такие бюретки и применяются обычно для фармакопейного анализа [8, 23]) составляет 80 % ее объема [11], получим диапазон применения (6.4-9.6) мл. Руководство [11] же проводит валидацию в диапазоне от 20 % до 90 % объема бюретки, т.е. от 2 мл до 9 мл. Данный диапазон, с одной стороны, совершенно неоправданно широк, а с другой стороны не охватывает требуемое [1, 11] значение 9.6 мл.

Чем уже диапазон, тем легче добиться необходимой линейности, правильности и сходимости. Таким образом, Руководство [11] совершенно неоправданно ужесточает требования к метрологическим характеристикам методики

титрования, предъявляя к ним требования в тех областях (< 6.4 мл), где применение методики не предполагается. С другой стороны, калибровочная прямая может «загибаться» (например, за счет ацилирования аминогруппы уксусным ангидридом). Для рабочего диапазона объемов ((64-96) %) это может существенно сказываться на свободном члене и угле наклона, приводя к систематическим погрешностям. В то же время, построение калибровочной прямой и обработка ее методом наименьших квадратов в широком диапазоне объемов ((20-90) %) может нивелировать влияние этого «загибания» на параметры калибровочной прямой и не выявить, таким образом, систематическую погрешность.

8.2. Проверка линейности методики

Критерии 1-3 характеризуют линейность методики, Критерий 4 - сходимость и правильность.

В случае сравнительных методов - хроматографии и спектрофотометрии (в варианте метода стандарта) — свободный член калибровочной прямой (a_{obs}) характеризует систематическую погрешность методики и поэтому регламентируется при оценке линейности [1-6]. Угол наклона (b_{obs}) не играет при этом какой-либо роли, и требования к нему не регламентируются.

В случае прямого метода — титрования — ситуация существенно меняется. Здесь на систематическую погрешность методики влияют оба параметра калибровочной прямой — отклонение угла наклона (b_{obs}) от теоретического значения (b_{theor}) (регламентируется Критерием 1) и статистически значимое значение свободного члена (a_{obs}) (регламентируется Критерием 2). Это влияние может иметь разный знак и взаимно компенсироваться для рабочей области объемов бюретки (около 8 мл [11]), поэтому систематическая погрешность характеризуется их алгебраической суммой — Критерием 4. Поэтому, вообще говоря, раздельная регламен-

Таблица 7

Требования к метрологическим характеристикам титриметрических методик при их валидации в соответствии с требованиями ЕФ [11]

Вид титрования	Допуски содержания ($\max \Delta_{As} \%$), \pm	$RSD_{rep} \%, \leq$	$\Delta_R(p=0.95; n=5)$	Правильность, $\delta \%, \leq$
кислотно-основное	1.0	0.33	0.31	0.67
неводное	1.0	0.33	0.31	0.67
титрование сопряженных оснований кислот	1.0	0.33	0.31	0.67
окислительно-восстановительное	1.5	0.50	0.48	1.0
аргентометрическое	1.5	0.50	0.48	1.0
комплексометрическое	2.0	0.67	0.64	1.33

тация угла наклона b_{obs} и свободного члена a_{obs} калибровочной прямой для целей валидации не нужна, а, следовательно, не нужны и *Критерии 1 и 2* (об этом, фактически, прямо говорится в *Критерии 4*). Сами же конкретные значения этих критериев — (15a), (15b), (17a) и (17b) — носят явно искусственный характер, никак не связанный с валидацией конкретной методики титрования.

Вызывает возражение формулировка *Критериев 1-3* отдельно для потенциометрического и индикаторного титрования. В суммарной Табл. 7 требования к допускам содержания и метрологическим характеристикам методик титрования никак не специфицированы отдельно для этих способов определения точки эквивалентности. Поскольку в Табл. 7 требования к метрологическим характеристикам методик определяются только допусками содержания, неважно, каким способом проводится определение точки эквивалентности, если допуски одни и те же.

Следует отметить, что *Критерии 1-3* совершенно не связаны с допусками содержания, т.е. они одинаковы, например, для допусков $\pm 1\%$ и $\pm 2\%$, хотя очевидно, что требования к метрологическим характеристикам здесь разные. В частности, *Критерий 3* (требования к остаточному стандартному отклонению) напрямую связан со сходимостью результатов анализа [1-6]. Кроме того, отсутствуют требования к коэффициенту корреляции, а в соответствии с требованиями [1, 11] при проведении валидации эти данные по коэффициенту корреляции должны представляться (и, соответственно, оцениваться).

Критерий 1 проверяет близость фактического эквивалента титруемого вещества к его теоретическому значению. Несовпадение эквивалента с теорией может быть связано с неправильным определением точки эквивалентности, разложением вещества, химическими реакциями и др. Именно эти факторы (которые связаны с валидацией методики) и проверяет данный критерий.

Однако отклонение фактического эквивалента от теоретического значения могут быть вызваны и другими причинами, которые никак не связаны с валидацией методики и совершенно не учитываются *Критерием 1*. Важнейшими из таких причин являются примеси в субстанции и погрешность в определении фактической концентрации титрованного раствора.

Так, в ранидина гидрохлориде (где количественное определение проводится потенциометрическим титрованием натрия гидроксидом)

[8, 23] содержание сопутствующих примесей не должно превышать 1.0 % (0.5 % примеси А и 0.5 % суммы остальных примесей) при допусках содержания (98.5-101.5)%. Влияние на угол наклона калибровочной прямой (b_{obs}) такого большого (но допускаемого по Фармакопее) количества примесей может быть выше требований (13a) и (13b) *Критерия 1*.

В общем случае, если примеси идентифицированы (принцип «прозрачности» монографий — один из главных принципов ЕФ) и количественно определены (соответствующим разделом монографии ЕФ), то их вклад в титрование можно учесть. Именно так и поступает ЕФ при установлении допусков содержания [26-27]. Другим возможным подходом является использование принципа незначимости [1, 10] — если содержание примесей ниже некоторого предела, то они значимо не влияют на проведение валидации.

Другим очевидным фактором, влияющим на отклонение фактического эквивалента от теоретического, является погрешность определения концентрации титрованного раствора, которая, как видно из Табл. 4, может быть вполне сравнима (особенно для неводных или вторичных титрантов) с требованиями (15a) и (15b) *Критерия 1*.

Поэтому сам факт выполнения или невыполнения *Критерия 1* еще не свидетельствует о приемлемой близости фактического и теоретического эквивалентов для анализируемого вещества.

Второе возражение против применения *Критерия 1* состоит в том, что он абсолютно не учитывает статистическую неопределенность величины b_{obs} , полученную методом наименьших квадратов. В то же время, относительные стандартные отклонения данной величины могут достигать 0.9 % [3, 6] при соблюдении всех требований к линейности. Поэтому требования (15a) и (15b) отклонения от теоретического значения не более чем на 0.3 % (потенциометрия) или 0.5 % (индикаторное титрование), не является всегда статистически корректными.

Точно также статистически некорректными являются и требования *Критерия 2* (17a) и (17b) — такие величины свободного члена (0.4 % для потенциометрии и 0.6 % для индикаторного титрования) вполне могут быть статистически незначимыми [3, 6].

Таким образом, *Критерии 1-3* (и весь подход *Руководства* [11] в целом) не проверяют в достаточной степени приемлемость линейности для решения поставленной задачи — количественного определения конкретного ле-

картвенного средства методом титрования (а это и есть цель валидации), а оценивают ее для какого-то общего (неясно какого) случая.

8.3. Проверка сходимости и правильности

Для проверки сходимости можно было бы использовать остаточное стандартное отклонение вокруг прямой (*Критерий 3*) [1-6], поскольку оно является прямой характеристикой сходимости методики при разных объемах титрования. Однако для оценки сходимости методики *Руководство* [11] использует относительное стандартное отклонение (*RSD*) из не менее 6 повторных титрований. Величина *RSD* для разных методов титрования должны удовлетворять требованиям Табл. 7. Эти требования (от 0.33 % до 0.67 %) никак не связаны с требованиями к максимальному остаточному стандартному отклонению (18a) и (18b) *Критерия 3* (0.3 % для потенциометрии и 0.5 % для индикаторного титрования), хотя, в общем, это одна и та же неопределенность.

Табл. 7 отражает подход *Руководства* [11] к соотношению сходимости и правильности при валидации титриметрических методик количественного определения. Он состоит в том, что симметричные допуски содержания (которые в случае субстанций являются доверительным интервалом максимально допустимой полной неопределенностью методики анализа [1-6]) делятся на 3 части. 1/3 допуска — это максимальное *RSD* сходимости из не менее 6 повторных титрований, а 2/3 допуска — это максимальная систематическая погрешность.

Данный подход характеризует подход ЕФ к критериям валидации титриметрических методик количественного определения ЛС. ЕФ считает, что систематическая погрешность титриметрии, в силу большого числа неконтролируемых факторов (см. выше п. 2), принципиально неустранима и значительно превосходит случайную составляющую неопределенности. Последняя составляет меньшую часть суммарной неопределенности аналитической методики.

Формально, некорректно складывать *RSD* с систематической погрешностью, которая является доверительным интервалом. Но при $RSD = 0.33\%$ односторонний доверительный интервал среднего результата из 5 повторных титрований (наиболее типичное число повторностей в аналитической практике) будет $\Delta_R = 2.13 \cdot 0.33 / \sqrt{5} = 0.315 \approx 0.33\%$ (аналогично и для $RSD = 0.50\%$ и 0.67% (Табл. 7)). Поэтому, практически, противоречий здесь нет. Надо только указывать, что число повторных титрований в методике должно быть не менее 5.

Как показано выше, систематическая погрешность может быть вызвана влиянием примесей. По поводу влияния примесей на анализ в *Руководстве* [11] лишь говорится, что «они должны присутствовать в малых концентрациях, в противном случае необходимо использовать другие методы количественного определения». Однако критерии этой «малости» не приводятся. В то же время, очевидно, что невозможно говорить о корректной валидации методики количественного определения без оценки и регламентации влияния примесей.

Следует отметить одно важное обстоятельство — из Табл. 7 (а также из *Критериев 1-4*) видно, что *Руководство* вообще не рассматривает валидацию титриметрических методик с допусками содержания 0.5 %, возможно, считая, что для таких методик при рутинном анализе в рамках фармакопейного подхода (определение титра и собственно анализ проводится на разных бюретках и нередко в разное время) невозможно добиться необходимых метрологических характеристик. Учитывая проведенное выше обсуждение неопределенности титра, с этим трудно не согласиться. Но как быть с теми фармакопейными методиками (например, Табл. 1 — лимонная кислота), для которых уже установлены такие допуски?

Одним из эффективных выходов из данной ситуации является применение для этих методик метода стандарта — параллельное определение титра и собственно титрования из одной бюретки в одной и той же области объемов бюретки. При этом нивелируются термическое расширение титранта и систематическая погрешность бюретки. Данный подход не описан в Фармакопее, однако, применение его оправдано отсутствием в *Руководстве* [11] подходов к валидации таких методик.

9. Предлагаемый подход к валидации титриметрических методик

9.1. Постановка задачи

Титриметрия, в отличие от хроматографии — неспецифический метод количественного определения. Поэтому задача количественного титриметрического определения субстанций — не определить содержание основного вещества, а убедиться в том, что оно значимо не отличается от 100 %. Содержание основного вещества можно определить как (100 % - содержание примесей). Примеси же в монографии контролируются другими тестами (как правило, хроматографическими), что обеспечивает необходимую специфичность количественного определения. Поэтому задача валидации количествен-

ных титриметрических методик — убедиться в том, что в процессе титрования субстанции с содержанием примесей в пределах требований монографии результаты количественного определения получаются с необходимой точностью и прецизионностью и не выходят за регламентируемые допуски. Сами примеси при этом также могут титроваться, искажая результаты фактического содержания основного вещества. В этом нет ничего страшного до тех пор, пока эти результаты находятся в пределах допусков монографии. Отметим, что именно такой подход был применен нами при аттестации стандартных образцов для количественного спектрофотометрического анализа [28].

Как видно, постановка задачи при проведении валидации титриметрических методик существенно отличается от таковой при валидации хроматографических методик [1-6]. Соответственно, должны быть изменены и критерии валидации.

В соответствии с подходом ЕФ (Табл. 7, *Критерии 1-4*), излагаемый далее подход применим к валидации методик титрования только для субстанций и готовых ЛС с допусками содержания $\pm 1\%$ и шире. Это согласуется с выводами п. 6. Для допусков $\pm 0.5\%$ целесообразно применять титрование в варианте метода стандарта с соответствующими изменениями в процедуре проведения валидации.

9.2. Требования к чистоте субстанции, используемой для проведения валидации

При валидации методик анализа, основанных на сравнительных методах (хроматография, спектрофотометрия и др.), не возникает проблем с оценкой систематической погрешности методики — она легко оценивается из результатов исследования линейности [1-6]. При этом влияние содержания примесей в пределах спецификации в значительной степени компенсируется стандартом (либо это влияние легко оценивается). Особенно это характерно для хроматографии. Титрование является прямым методом, что вызывает затруднения при оценке систематической погрешности методики. Главной причиной является неизбежное присутствие примесей, вызывающих систематическую погрешность, не связанную с систематической погрешностью собственно титриметрической методики. Для оценки последней могут быть использованы следующие подходы:

- 1) использование стандартных образцов со 100 %-ным содержанием основного вещества;
- 2) использование результатов анализа, полученных по другой валидированной методике;

3) количественное определение всех примесей с последующей оценкой их влияния на титрование.

Все три подхода имеют свои ограничения и недостатки.

Использование 100 %-ных стандартных образцов (подход 1) для проведения валидации очень дорого. Кроме того, необходимо все равно учитывать остаточную (или приобретенную в процессе проведения анализа) влагу. Главным же недостатком является необходимость обязательной оценки влияния примесей в реальных анализируемых объектах (в частности, субстанциях) на результаты титрования (т.е. использования подхода 3). Ведь методика валидируется для анализа не сверхчистого вещества, а реальной субстанции. Но можно ведь сразу использовать подход 3.

Использование результатов анализа, полученных другой валидированной методикой (подход 2), несмотря на свою кажущуюся простоту и логичность, практически не применимо для оценки систематической погрешности методик титриметрического количественного определения субстанций. Это связано со статистической неопределенностью результатов и достаточно жесткими допусками содержания в субстанциях (Табл. 1). Так, если титриметрической методикой получено содержание основного вещества в оксазепаме ($100.5 \pm 0.6\%$) (допуски $99.0-101.0\%$), Табл. 1), а другим методом ($99.6 \pm 0.7\%$), мы не можем говорить о наличии систематической погрешности в титриметрической методике, хотя она может быть значительна.

Подход 3 является официальным подходом ЕФ при установлении допусков содержания основного вещества методом титрования [26-27] и, вроде бы, решает все проблемы. Но он требует обязательной идентификации всех примесей и их количественного определения в конкретном образце, используемом для валидации. А это не всегда возможно.

Нетрудно видеть, что ни один из описанных подходов не проводит оценку значимости влияния примесей на результаты титрования. Предельно допустимая неопределенность методик количественного определения $\max \Delta_{\Delta_s}$ должна удовлетворять требованиям соотношений (3-4). Погрешность, вносимая примесями, является систематической. Если эта погрешность удовлетворяет соотношению (5), примеси не оказывают значимого влияния на результаты титриметрического количественного определения (см. п. 5.1). Если концентрация i -ой примеси равна Im_i , ее эквивалент Eq_i , а эк-

вивалент основного вещества Eq_s , то по аналогии с аттестацией стандартных образцов для спектрофотометрического анализа [28] и учитывая (5), можно сформулировать требования к незначимому содержанию примесей:

$$\left| \sum_i Im_i \cdot \left[\frac{Eq_s}{Eq_i} - 1 \right] \right| \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (21)$$

На практике одни примеси имеют эквивалент меньше, чем у основного вещества (завышая результаты титрования), другие — меньше (занижая результаты). Если эквивалент примеси совпадает с эквивалентом основного вещества, эта примесь никак не влияет на результаты. К сожалению, эквиваленты примесей и содержание каждой конкретной примеси нередко неизвестны, что затрудняет применение соотношения (21). Учитывая исключительную редкость случая, когда эквиваленты всех примесей более чем в два раза меньше эквивалента основного вещества, можно записать:

$$\left| \sum_i Im_i \cdot \left[\frac{Eq_s}{Eq_i} - 1 \right] \right| \leq \sum_i Im_i. \quad (22)$$

С учетом этого, можно записать более жесткое, но простое соотношение незначимости содержания примесей в субстанции для проведения валидации:

$$\sum_i Im_i \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (23)$$

Сумма примесей $\sum Im_i$ обычно известна и регламентируется монографией, что делает соотношение (23) удобным для применения. Если соотношение (23) не выдерживается, следует проверять выполнение более общего соотношения (21).

Естественно, что соотношения (21-23) предполагают предварительный учет потери в массе при высушивании.

9.3. Нормализованные координаты

Стандартизованные процедуры валидации аналитических методик, развитые нами ранее [1-6] для сравнительных методов, опираются на использование нормализованных координат, что дает возможность сформулировать унифицированные критерии, не зависящие от специфики валидируемых методик. Поэтому целесообразно применить эти координаты и для валидации титриметрических методик. Это дает возможность также использовать полученные ранее критерии.

При проверке линейности по оси ординат откладывают объем титрования (V_i), а по оси абсцисс — навеску, взятую для титрования

(m_i). В валидируемой методике указывается номинальная навеска m_T (в граммах или миллиграммах). Данной номинальной навеске соответствует номинальный объем титрования в мл V_T , равный:

$$V_T = \frac{m_T}{K_T \cdot m_{1mL}} \cdot \left(1 - \frac{LD}{100} \right), \quad (24)$$

где:

m_{1mL} — количество грамм (миллиграмм) титруемой субстанции, соответствующей 1 мл титрованного раствора номинальной концентрации,

K_T — коэффициент поправки к номинальной концентрации титрованного раствора,

LD — потеря в массе при высушивании (или содержание воды), в процентах.

В обычном фармакопейном титровании, в отличие от хроматографии и спектрофотометрии, отсутствует стандарт, поэтому для перевода в нормализованные координаты исследуемую навеску целесообразно разделить на номинальную навеску m_T , указанную в методике. Соответственно, получим следующие нормализованные координаты [1-6]:

$$\begin{aligned} X_i (\%) &= \frac{m_i}{m_T} \cdot 100; \\ Y_i (\%) &= \frac{V_i}{V_T} \cdot 100; \\ Z_i (\%) &= \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100. \end{aligned} \quad (25)$$

Величины X_i и Y_i , Z_i имеют тот же смысл, что и для хроматографического анализа методом стандарта [1-6]. В частности, Z_i представляет собой коэффициент извлечения, т.е. отношение (найдено/введено)%.

9.4. Диапазон

Как и для хроматографических методик [1-6], все валидационные характеристики целесообразно получать одновременно с исследованием линейности. В принципе, для этого вполне достаточно 7 точек, как это и рекомендует *Руководство ЕФ* [11]. Однако, чтобы не менять уже отработанный подход [1-6], целесообразно брать 9 точек (формальные требования к изучению прецизионности), что позволяет получать также и менее жесткие критерии (за счет увеличения числа степеней свободы).

В соответствии с требованиями ГФУ [1], диапазон должен быть не уже (80-120) % от номинального значения. Как уже указывалось в п. 4.1, номинальный объем бюретки вместимостью 10 мл (а именно такие бюретки обычно и

применяются для фармакопейного анализа [8, 23]) составляет 80 % ее объема [11]. Соответственно, получим диапазон применения (6.4 - 9.6) мл. Разбивая его на 9 точек, получим (с шагом 5 % = 0.4 мл): 6.4 мл, 6.8 мл, 7.2 мл, 7.6 мл, 8.0 мл, 8.4 мл, 8.8 мл, 9.2 мл, 9.6 мл. Безусловно, данные величины, могут колебаться в пределах 0.05 мл. Навески, которые берутся для титрования, должны соответствовать этим объемам бюретки. Для этого интервала ((80-120)%) рассчитанное значение s_V составляет 13.69 % [1].

9.5. Критерии линейности

В нормализованных координатах исследуется линейная зависимость $Y_i = a + b \cdot X_i$ [1-6]. Поскольку мы используем нормализованные координаты, то развитые ранее подходы [1-6] для оценки параметров этой регрессии остаются в силе. Титрование, однако, имеет свои особенности, что приводит к другим критериям приемлемости.

9.5.1. Систематическая погрешность

С учетом анализа факторов, влияющих на точность титриметрии, подход ЕФ к правильности титриметрических методик (Табл. 7) представляется корректным. Требования к систематической погрешности (δ) ЕФ (Табл. 7) можно записать в виде:

$$\delta\% \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As} \tag{26}$$

При титровании субстанций (а это главное применение титриметрии) $\max \Delta_{As}$ совпадает с симметричными допусками содержания.

В случае методик титрования требования к свободному члену a заменяются требованиями к величине δ_{RL} (правильность регрессионной прямой) из соотношения (19), которая представляет собой относительную систематическую погрешность расчетов по линейной регрессии. Данная погрешность рассматривается ЕФ [11] как отклонение точек фактической прямой от теоретической для номинального объема V_T . Данная трактовка вызывает возражения, поскольку для номинального объема погрешность может быть равна нулю (за счет взаимной компенсации погрешностей), а для других объемов диапазона она может быть существенной.

Например, для уравнения $V_i = 2 + 30 \cdot m_i$ при номинальной навеске $m_T = 0.2$ г и номинальном объеме титрования $V_T = 8$ мл наблюдается нулевая погрешность. В то же время, для навески 0.16 г (80 % от номинальной) мы получим $V = 6.8$ мл, в то время как теоретическое значение равно $8 \cdot 0.8 = 6.4$ мл, т.е. погрешность составит

0.4 мл или более 6 %. Поэтому погрешность прямой следует проверять не для номинального значения, а для наихудшего случая — на краях диапазона (80 % или 120 % от номинального значения).

В нормализованных координатах теоретическая прямая — это $Y_i^{theor} = X_i$, т.е. прямо пропорциональная зависимость с коэффициентом наклона $b_{theor} = 1$. Поэтому относительное отклонение (в процентах) фактической прямой от теоретической для произвольного нормализованного объема Y_i^{theor} равно

$$\begin{aligned} \delta_{RL,i}(\%) &= 100 \cdot \left| \frac{Y_i - Y_i^{theor}}{Y_i^{theor}} \right| = \\ &= 100 \cdot \left| \frac{a + b \cdot X_i - X_i}{X_i} \right| = \\ &= 100 \cdot \left| \frac{a}{X_i} + (b - 1) \right|. \end{aligned} \tag{27}$$

Величина δ_{RL} представляет собой систематическую погрешность и поэтому должна удовлетворять требованиям (26) для самого худшего случая — на границах диапазона — для $X_i = 80$ % и $X_i = 120$ % от номинального объема, т.е.:

Практическая незначимость:

$$\begin{aligned} \delta_{RL,80} &= 100 \cdot \left| \frac{a}{80} + (b - 1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As} \\ \delta_{RL,120} &= 100 \cdot \left| \frac{a}{120} + (b - 1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As}. \end{aligned} \tag{28}$$

Критические значения величин $\delta_{RL,80}$ и $\max \delta_{RL,120}$ представлены в Табл. 8.

Соотношение (28) представляет собой требование практической незначимости величины δ_{RL} . Статистическая же незначимость означает, что величины a и $|b - 1|$ не превышают доверительных интервалов своей неопределенности. При этом необходимо учитывать, что на практике анализ проводится из k параллельных титрований. В частности, для числа точек прямой $n = 9$ и $k = 5$ получим:

Статистическая незначимость:

$$\begin{aligned} a &\leq \frac{t(95\%, n - 2) \cdot s_a}{\sqrt{k}} = \frac{1.89 \cdot s_a}{\sqrt{5}} = 0.85 \cdot s_a \\ |b - 1| &\leq 0.85 \cdot s_b. \end{aligned} \tag{29}$$

9.5.2. Остаточное стандартное отклонение (s_o)

В соответствии с подходом ЕФ (Табл. 7), доверительный интервал случайной составляющей неопределенности титриметрической методики анализа составляет примерно треть полной неопределенности $\max \Delta_{As}$, которая в

случае субстанций совпадает с симметричными допусками содержания, т.е.

$$\Delta_R \% \leq \frac{1}{3} \cdot \max \Delta_{As}. \quad (30)$$

Одним из главных отличий проверки линейности методик титрования от хроматографии является то, что точки регрессии являются единственным результатом анализа по спецификации одной навески испытуемой пробы. Заключение же о качестве делается по результатам титрования определенного количества (k) навесок. В зависимости от величины k изменяется доверительный интервал среднего результата, который характеризует случайную составляющую неопределенности методики титрования, т.е., учитывая (29), получим [1-6, 9]:

$$\Delta_R = \frac{t(95\%, n-2) \cdot s_o}{\sqrt{k}} \leq \frac{1}{3} \cdot \max \Delta_{As}. \quad (31)$$

Поскольку величина s_o получена для $n = 9$ точек линейной зависимости, коэффициент Стьюдента берется для числа степеней свободы $n-2 = 7$ [1].

Учитывая соотношения (3-4), можно найти требования к остаточному стандартному отклонению s_o , но для этого необходимо стандартизовать величину k . Методики титрования характеризуются достаточно низкими значениями стандартных отклонений сходимости, что во многих случаях позволяет получить приемлемые результаты даже при титровании всего $k = 2-3$ навесок. Однако следует принимать во внимание, что эти методики валидируются обычно для рутинного анализа субстанций или готовых лекарственных средств, и от этого анализа часто зависит заключение о качестве большой партии продукции. Учитывая также простоту, быстроту выполнения и дешевизну методик титрования, для получения статистически на-

дежных результатов при серьезных анализах нельзя проводить менее 5 параллельных титрований, т.е. должно быть $k \geq 5$. Тогда из соотношения (31) получим требования к остаточному стандартному отклонению s_o :

$$s_o \leq \frac{\sqrt{5} \cdot \max \Delta_{As}}{3 \cdot t(95\%, 7)} = \quad (32)$$

$$\frac{2.24}{3 \cdot 1.89} \cdot \max \Delta_{As} = 0.39 \cdot \max \Delta_{As}.$$

Критические значения величин s_o представлены в Табл. 8.

9.5.3. Коэффициент корреляции (r)

Коэффициент корреляции рассчитывается по формуле [1-6, 9]:

$$R_c = r = \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_Y^2}}. \quad (33)$$

Зная величины s_o и учитывая, что $s_Y = 13.69\%$ для диапазона (80-120)% (9 точек) [1-6], можно рассчитать критические значения коэффициента корреляции R_c , которые представлены в Табл. 8.

Учитывая высокие значения коэффициентов корреляции r , иногда удобно пользоваться их квадратами r^2 , которые также представлены в Табл. 8.

9.5.4. Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

Данные величины не требуются при проведении валидации методик количественного определения, но они полезны как информация о том, насколько диапазон применения методики превосходит ее предельные возможности («запас прочности» методики).

Величины ПО и ПКО рассчитываются из стандартного отклонения свободного члена линейной зависимости s_a и ее угла наклона b

Таблица 8

Критические значения систематической (\max) и полной неопределенности ($\max \Delta_{As}$) количественных методик титрования и параметров линейной зависимости $Y_i = b \cdot X_i + a$ для различных испытаний, $g = 9$ точек, $s_Y = 13.69\%$ и различных допусков содержания B

$B, \%$	$\max \Delta_{As} \%$	$\max \delta = \text{большее из } \max \delta_{RL,80} \text{ и } \max \delta_{RL,120}, \%$	$s_o, \%$	$\min r$	$\min r^2$
субстанции					
0.5	0.5	0.33	0.20	0.99990	0.99979
1.0	1.0	0.67	0.39	0.99959	0.99917
1.5	1.5	1.00	0.59	0.99907	0.99814
2.0	2.0	1.33	0.79	0.99835	0.99670
готовые лекарственные средства					
5.0	1.6	1.07	0.63	0.99894	0.99789
7.5	2.4	1.60	0.94	0.99762	0.99524
10.0	3.2	2.13	1.26	0.99576	0.99154

так же, как и для хроматографических методик [1-6].

$$ПО = 3.3 \cdot s_a / b \approx 3.3 \cdot s_a \quad (34)$$

$$ПКО = 10 \cdot s_a / b \approx 10 \cdot s_a \quad (35)$$

9.6. Правильность и прецизионность

Оцениваются точно так же, как и для хроматографических методов, из данных, полученных при изучении линейности [1-6].

10. Экспериментальная часть

Проверку предлагаемого подхода проводили на пример кислотно-основного индикаторного титрования (индикатор – фенолфталеин) субстанции таурина (титрование 0.1 М раствором натрия гидроксида).

Методика. Около $m_T = 250$ мг (точная навеска) субстанции растворяют в 30 мл воды *P*, прибавляют 5.0 мл раствора формальдегида *P* и титруют 0.1 М раствором натрия гидроксида до слабо-розового окрашивания (индикатор – 0.1 мл раствор фенолфталеина *P1*).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0.1 М раствора натрия гидроксида соответствует 12.52 мг $C_2H_7NO_3S$.

Содержание $C_2H_7NO_3S$ (2-аминоэтансульфоновой кислоты) в субстанции должно быть не менее 99.0 % и не более 101.0 %, в пересчете на сухое вещество. Таким образом, учитывая (3), $max\Delta_{As} = 1.0$ %.

Чистота субстанции, используемой для проведения валидации (см. п. 9.2). Для проведения валидации методики титрования использовали серию № 401107 субстанции таурина, которая соответствовала требованиям действующей спецификации. При этом потеря в массе при высушивании составляла 0.043 %.

Контроль сопутствующих примесей проводится методом ТСХ. Никаких дополнительных пятен обнаружено не было (т.е. содержание примесей менее 0.1 %), поэтому можно считать, что выполняется требование (23) к чистоте субстанции, используемой для проведения валидации титриметрических методик (т.е. $\sum m_i \leq 0.32 \cdot max\Delta_{As} = 0.32$ %). Учитывая это и незначительную потерю в массе при высушивании (0.043 %), в дальнейших расчетах содержание основного вещества принималось равным 100.0 %.

Стандартизация титранта. С целью уменьшения неопределенности, установку титра 0.1 М раствора натрия гидроксида проводили не по 0.1 М раствору кислоты хлористоводородной (как по ГФУ [8]), а по фармакопейному образцу исходного стандартного вещества для титрованных растворов - калия гидрофталата *PO* (*M.M.* = 204.2 у.е.). При этом, около 0.45 г

(точная навеска) калия гидрофталата *PO*, высушенного до постоянной массы, растворяли в 30 мл воды *P* и титровали 0.1 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0.1 мл раствор фенолфталеина *P1*, как для субстанции) до перехода окраски. Было получено среднее из 5 параллельных титрований. Значение коэффициента поправки к номинальной концентрации титрованного раствора $K_T = 1.0159$ с относительным стандартным отклонением $RSD = 0.11$ % и доверительным интервалом $\Delta(titr) = 0.11$ %. Как видно, выдерживаются требования ГФУ и ЕФ по сходимости результатов определения титра (≤ 0.2 %) (см. п. 3.1).

Номинальный объем титрования (см. формулу (24)).

$$V_T = \frac{m_T}{K_T \cdot m_{1ml}} \cdot \left(1 - \frac{LD}{100}\right) = \frac{250}{1.0159 \cdot 12.52} \cdot \left(1 - \frac{0}{100}\right) = 19.66 \text{ мл} \quad (36)$$

Номинальный объем титрования составляет 78.6 % от объема бюретки вместимостью 25 мл, т.е. соответствует требованиям ГФУ – около 80 % [8, 23].

Влияние индикатора. Раствор фенолфталеина *P1* - это раствор 10 мг/мл фенолфталеина (*M.M.* = 318.3 у.е.) в 96 % спирте [8]. 0.1 мл этого раствора содержат $0.1 \cdot 10 / 318.3 = 0.00314$ мг-моль фенолфталеина, на титрование которых уйдет $0.00314 / (1.0159 \cdot 0.1) = 0.031$ мл 0.10159 М раствора натрия гидроксида. Это составляет $100 \cdot 0.031 / 19.7 = 0.16$ % ≤ 0.32 % от номинального объема титрования, что незначимо по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа $max\Delta_{As} = 1.0$ %.

Объем холостого опыта $V_o = 0.37$ мл, что составляет 1.9 % от номинального объема титрования. Столь значимая величина V_o связана с неизбежным присутствием в формальдегиде продукта окисления – муравьиной кислоты.

Навески для изучения линейности. Брали навески субстанции таурина для разных точек (*i*) прямой, которые составляли 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 115 % и 120 % от номинальной массы 250 мг. Для исследования воспроизводимости результатов для разных опытов по изучению линейности, брали по 2 навески для каждой точки (*i*), обозначая их соответствующими индексами как i_1 и i_2 (Табл. 9). Соответственно, получали 2 набора по 9 точек, которые отдельно обрабатывали методом наименьших квадратов по прямой. Для сравнения обрабатывали также объединенную выборку из 18 точек, для которой от-

дельно рассчитывали критерии по принципам, изложенным выше.

Нормализованные координаты. В формулах (25) использовали $m_T = 250$ мг и $V_T = 19.66$ мл. Величины X_i , Y_i и Z_i представлены в Табл. 9.

Линейная зависимость. Результаты обработки по прямой методом наименьших квадратов каждого из двух наборов 9 точек представлены в Табл. 10. Критерии взяты из Табл. 8 (для субстанций) и соотношений (28-29). Для сравнения обрабатывали также объединенную выборку из 18 точек, для которой отдельно рассчитывали критерии по принципам, изложенным выше.

Как видно из Табл. 10, требование одновременной статистической незначимости величин $|a|$ и $|1-b|$ не выполняется для обоих наборов из 9 точек. Не выполняется оно даже для всего набора из 18 точек. В то же время, оба набора из 9 точек и объединенный набор из 18 точек удовлетворяют требованиям практической приемлемости линейной зависимости.

Отметим, что максимальная величина систематической погрешности может достигаться как при 80 % номинального содержания ($\delta_{RL,80}$) – набор i_2 и объединенный набор из 18 точек, так и при 120 % ($\delta_{RL,120}$) – набор i_1 . Это подтверждает необходимость использования соотношения (28) практической незначимости систематической погрешности прямой.

Сравнение наборов i_1 и i_2 показывает, что параметры линейной зависимости могут заметно отличаться друг от друга (особенно

наглядно это видно по величинам a). Однако сам вывод о приемлемости линейной зависимости при этом не меняется. Не меняется он и при расширении набора точек (с 9 до 18). Данный важный результат свидетельствует о воспроизводимости валидационных исследований линейности.

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

В Табл. 10 также для информации приведены рассчитанные по уравнениям (34-35) пределы обнаружения (ПО) и пределы количественного определения (ПКО). Все они не превышают 32 %, т.е. значимо не влияют на проведение количественного определения [4].

Прецизионность и правильность

Как видно, требование статистической незначимости систематической погрешности может как выполняться (набор i_2), так и не выполняться (набор i_1 и расширенный набор из 18 точек). Практическая же незначимость систематической погрешности выполняется для всех исследованных наборов. Выполняется и требование практической приемлемости прецизионности из 6 повторных титрований.

В целом, методика отвечает требованиям прецизионности и правильности.

Выводы

Проведено систематическое обсуждение факторов, влияющих на погрешности мето-

Таблица 9

Результаты исследования линейности в нормализованных координатах

Шифр навески	Навеска таурина, m_n мг	X%	V_n мл	$V_i - V_0$	Y%	Z %
80_1	203.6	81.44	16.4	16.03	81.55	100.14
80_2	200.2	80.08	16.05	15.68	79.77	99.62
85_1	210.0	84.00	16.85	16.48	83.84	99.81
85_2	212.5	85.00	17.00	16.63	84.61	99.54
90_1	222.7	89.08	17.77	17.4	88.52	99.38
90_2	224.7	89.88	17.97	17.6	89.54	99.62
95_1	237.4	94.96	18.95	18.58	94.53	99.55
95_2	240.5	96.20	19.19	18.82	95.75	99.53
100_1	245.3	98.12	19.55	19.18	97.58	99.45
100_2	253.8	101.52	20.25	19.88	101.14	99.63
105_1	264.2	105.68	21.05	20.68	105.21	99.56
105_2	263.6	105.44	21.03	20.66	105.11	99.69
110_1	274.0	109.60	21.83	21.46	109.18	99.62
110_2	276.0	110.40	22.00	21.63	110.05	99.68
115_1	287.8	115.12	22.85	22.48	114.37	99.35
115_2	281.0	112.40	22.63	22.26	113.25	100.76
120_1	300.4	120.16	23.95	23.58	119.97	99.84
120_2	301.7	120.68	24.07	23.70	120.58	99.91

дик количественного титрования лекарственных средств.

Проведено систематическое обсуждение подхода Европейской Фармакопеи к валидации методик количественного титрования и показаны его недостатки.

Предложена обоснованная стандартизованная процедура проведения валидации методик количественного титрования, апробированная на примере методики количественного определения субстанции таурина.

ЛИТЕРАТУРА

1. 2.2.N.2. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 58-67. – Доповнення 1. – 2004. – С. 2-4. – Доповнення 2. – 2008. – С. 85-100.
 2. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина. – Москва, 2007. – 57 с.
 3. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.Н., Подпужников Ю.В. // Фармаком. – 2004. - № 3. – С. 3-17.

Таблица 10

Характеристики линейной зависимости $Y = a + b \cdot X$

Параметр	Значение	Стандартное отклонение (SD)	Критерий статистической незначимости ($\leq 0.85 \cdot SD$)	Критерий практической приемлемости	Вывод
<i>набор i_1</i>					
A	0.47	0.64	$ a \leq 0.54$		соотв.
B	0.9915	0.0063			
1-b	0.0085	0.0063	$ 1-b \leq 0.0054$		не соотв.
s_o	0.246			≤ 0.39	соотв.
R	0.99986			≥ 0.99959	соотв.
r^2	0.99973			≥ 0.99917	соотв.
$\delta_{RL,80}$	0.26			≤ 0.67	соотв.
$\delta_{RL,120}$	0.46			≤ 0.67	соотв.
ПО		2.1			
ПКО		6.4			
<i>общий вывод о линейности для набора i_1</i>					соотв.
<i>набор i_2</i>					
a	-1.59	1.02	$ a \leq 0.87$		не соотв.
b	1.0137	0.0101			
1-b	0.0137	0.0101	$ 1-b \leq 0.0086$		не соотв.
s_o	0.386			≤ 0.39	соотв.
r	0.99965			≥ 0.99959	соотв.
r^2	0.99930			≥ 0.99917	соотв.
$\delta_{RL,80}$	0.59			≤ 0.67	соотв.
$\delta_{RL,120}$	0.059			≤ 0.67	соотв.
ПО		3.4			
ПКО		10.2			
<i>общий вывод о линейности для набора i_2</i>					соотв.
<i>все 18 точек</i>					
a	-0.54	0.65	$ a \leq 0.51^*$		не соотв.
b	1.0025	0.0064			
1-b	0.0025	0.0064	$ 1-b \leq 0.0050^*$		соотв.
s_o	0.35			≤ 0.39	соотв.
r	0.99967			≥ 0.99959	соотв.
r^2	0.99934			≥ 0.99917	соотв.
$\delta_{RL,80}$	0.43			≤ 0.67	соотв.
$\delta_{RL,120}$	0.20			≤ 0.67	соотв.
ПО		2.1			
ПКО		6.5			
<i>общий вывод о линейности объединенного набора 18 точек</i>					соотв.

Примечание.

* 0.78·SD.

4. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии стандарта / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Загорий В.А. // Фармаком. - 2005. - № 2-3. - С. 78-94.
5. Стандартизованная процедура валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии / Гризодуб А.И., Губаревич И.Г., Карпова Т.А., Никишина Л.Е., Леонтьев Д.А. // Фармаком. - 2005. - № 4. - С. 5-21.
6. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Фармаком. - 2006. - №1-2. - С. 35-44.
7. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Титриметрический метод анализа в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств: проблемы и подходы // Фармаком. - 2008. - № 2 - С. 65-77.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с. - Доповнення 2. - 2008. - 620 с.
9. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - С. 187-214.
10. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Физиологично активні речовини. - 2001. - № 1 (31). - с. 32-44.
11. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines. - 4th ed. - Council of Europe, Strasbourg, 2005. - 67 p.
12. Весы лабораторные электронные. Методика поверки. Методическая инструкция. - Харьков: ХГНИИМ, 2004. - 21 с.
13. ISO 385/1, Laboratory glassware - Burettes - Part 1: General requirements.
14. ISO 385/2, Laboratory glassware - Burettes - Part 2: Burettes for which no waiting time is specified.
15. ISO 385/3, Laboratory glassware - Burettes - Part 3: Burettes for which a waiting time of 30 s is specified.

Таблица 11

Результаты исследования прецизионности и правильности

X%	Y%	Z = 100·Y/X	X%	Y%	Z = 100·Y/X	X%	Y%	Z = 100·Y/X
все 18 точек			набор i_1			набор i_2		
81.44	81.55	100.14	81.44	81.55	100.14	80.08	79.77	99.62
80.08	79.77	99.62	84	83.84	99.81	85	84.61	99.54
84	83.84	99.81	89.08	88.52	99.38	89.88	89.54	99.62
85	84.61	99.54	94.96	94.53	99.55	96.2	95.75	99.53
89.08	88.52	99.38	98.12	97.58	99.45	101.52	101.14	99.63
89.88	89.54	99.62	105.68	105.21	99.56	105.44	105.11	99.69
94.96	94.53	99.55	109.6	109.18	99.62	110.4	110.05	99.68
96.2	95.75	99.53	115.12	114.37	99.35	112.4	113.25	100.76
98.12	97.58	99.45	120.16	119.97	99.84	120.68	120.58	99.91
101.52	101.14	99.63						
105.68	105.21	99.56						
105.44	105.11	99.69						
109.6	109.18	99.62						
110.4	110.05	99.68						
115.12	114.37	99.35						
112.4	113.25	100.76						
120.16	119.97	99.84						
120.68	120.58	99.91						
среднее (\bar{x})		99.70			99.63			99.78
SD		0.33			0.26			0.38
$\Delta_R(0.95; 17)$		0.13	$\Delta_R(0.95; 8)$		0.16	$\Delta_R(0.95; 8)$		0.24
$\delta = \bar{x} - 100 $		0.30			0.37			0.22
статистическая незначимость систематической погрешности: $\delta \leq \Delta_R$								
не выполняется: 0.30 > 0.13			не выполняется: 0.37 > 0.16			выполняется: 0.22 < 0.24		
практическая незначимость систематической погрешности: $\delta \leq 0.67$								
выполняется: $\Delta = 0.30 \leq 0.67$			выполняется: $\delta = 0.37 \leq 0.67$			выполняется: $\delta = 0.22 \leq 0.67$		
практическая приемлемость прецизионности из 6 повторных титрований: $\Delta_R(0.95; 5) = t(0.95; f) \cdot SD / \sqrt{5} \leq 0.33$								
выполняется: 0.25 ≤ 0.33			выполняется: 0.21 ≤ 0.33			выполняется: 0.32 ≤ 0.33		
общее заключение о прецизионности и правильности								
соответствует			соответствует			соответствует		

16. ГОСТ 29251-91 (ISO 385/1-84). Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования. — М.: Издательство стандартов, 1992. — 20 с.
17. ГОСТ 29252-91 (ISO 385/2-84). Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 2. Бюретки без установленного времени ожидания. — М.: Издательство стандартов, 1992. — 20 с.
18. ГОСТ 29253-91 (ISO 385/3-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 3. Бюретки с временем ожидания 30 с. — М.: Издательство стандартов, 1992. — 20 с.
19. ISO 4787-1984 (E), Laboratory glassware — Volumetric glassware — Methods for use and testing of capacity. — International Organization for Standardization, 1984. Printed in Switzerland. — 13 p.
20. Calibration of Burets and Pipets. - Chemistry 321L Manual. — P. 13-15.
21. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.Н. // Фармаком. — 2004. - № 2. — С. 20 - 34.
22. European Pharmacopoeia. - 3rd ed. — Council of Europe, Strasbourg, 1996. — 1799 p.
23. European Pharmacopoeia. - 6th ed. — Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. — 3308 p.
24. Справочник химика. - 2-е изд. - Ленинград-Москва: ГНТИ химической литературы, 1963. — Том 1. - С. 568.
25. International standard 648-77, Laboratory glassware — One mark pipettes.
26. ГОСТ 29169-91 (ISO 648 - 77). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.
27. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Content limits in the European Pharmacopoeia // Pharmeuropa. — 1997. - Vol. 9, № 1. - P. 148-156.
28. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Content limits in the European Pharmacopoeia // Pharmeuropa. — 1998. - Vol. 10, № 1. - P. 137-146.
29. Аттестация стандартных образцов для спектрофотометрического анализа лекарственных средств / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г., Доценко Т.Н. // Фізіологічно активні речовини. — 2000. - № 2 (30). - С. 38-44.

Резюме

Гризодуб О.І., Леонтьев Д.А., Чикалова С.О., Верушкин О.Г., Георгиевский В.П.

Стандартизована процедура валідації кількісних методик титрування лікарських засобів

Проведено систематичне обговорення факторів, що впливають на похибки методик кількісного титрування лікарських засобів. Проведено систематичне обговорення підходу Європейської Фармакопеї до валідації методик кількісного титрування і показані його недоліки. Запропоновано обґрунтовану стандартизовану процедуру проведення валідації методик кількісного титрування, що апробована на прикладі методики кількісного визначення субстанції таурину.

Summary

Gryzodub O.I., Leontiev D.A., Chikalova S.O., Verushkin O.G., Georgiyevskiy V.P.

Standardized procedure for titrimetric assays of drugs

Systematic discussion of factors, influencing titrimetric assay errors was carried out. The European Pharmacopoeia's

approach for titrimetric assay validation was systematically discussed and its imperfections were demonstrated. Grounded standardized procedure for the titrimetric assay validation that has been approved on the example of the taurine assay was suggested.

Гризодуб Александр Иванович (р. 1948). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГП ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992-2005). Директор ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 2005). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997). Член Международной федерации фармацевтов (2004). Член Научного Совета НАН Украины по проблеме «Аналитическая химия» (2004).

Леонтьев Дмитрий Анатольевич (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Работал в лаборатории хроматографии ГНЦЛС (1993-2005). Работает в ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». Руководитель группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ (с 1993). К.фарм.н. (1997). Зам. директора по науке ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (2005).

Чикалова Светлана Олеговна (р. 1972). Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1994). Работает в ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 1995). Научный сотрудник группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ.

Верушкин Алексей Геннадиевич (р. 1971). Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1993). Работает в ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 1997). Научный сотрудник лаборатории фармакопейного анализа.

Георгиевский Виктор Петрович (р. 1937). Окончил фармацевтическое отделение 1-го Московского медицинского института (1959). Д.фарм.н. (1980). Профессор (1983). Чл.-корр. НАН Украины. Засл. деятель науки и техники Украины. Главный научный консультант ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». Главный редактор журнала «Фармаком».

До видання Доповнення 3 до Державної Фармакопеї України

УДК 615.11

Котова Е.Е., Тихоненко Н.І., Котов А.Г., Груненко Я.А., Вовк О.Г., Тихоненко Т.М.
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Чебрець повзучий»

Проведено порівняльний аналіз показників якості трави чебрецю повзучого відповідно до вимог ЄФ і ГФ XI. Наявність у монографії ЄФ таких показників, як ідентифікація методом ТШХ, кількісне визначення ефірної олії, допускає прийняття цих методів аналізу якості ЛРС у відповідній монографії ДФУ. Проте, досліджена вітчизняна рослинна сировина не завжди задовольняла вимогам монографії ЄФ за вмістом ефірної олії (не менше 3.0 мл/кг) і хроматографічним профілем. Показано необхідність введення до монографії національної частини із показником вмісту ефірної олії- не менш 1.5 мл/кг та ідентифікацією ЛРС із даним вмістом ефірної олії методом ТШХ. Показано доцільність введення до національної частини монографії «Чебрець повзучий» такого показника якості, як вміст екстрактивних речовин.

Чебрець — *Thymus L.* — рід із родини *Lamiaceae (Labiatae)*, який налічує до 400 видів [1], близько 150 видів поширені по всій Євразії (крім топиків) і Африці [2], понад 170 видів наводились для флори колишнього СРСР [3]. Автори [4] вважають, що на території України зростають 40 видів чебрецю, інші автори [5] в результаті критичного дослідження прийшли до висновку, що у флорі України представлені лише 15 самостійних видів чебрецю, більшість «дрібних» видів вони перенесли у ранг синонімів. Серед дикорослих видів чебрецю найпоширеніші в Україні: ч. повзучий (*Thymus serpyllum L.*), ч. Маршалла (*Thymus marschallianus Willd.*), а ч. звичайний (*Thymus vulgaris L.*) культивується як пряно-ароматична культура [6, 7, 8].

Чебрець широко використовують у народній та офіційній медицині та фармації. В Україні як лікарську рослинну сировину (ЛРС) використовують 2 види: *T. serpyllum L.* і *T. vulgaris L.*, якість яких регламентується двома відповідними статтями ГФ XI [9]. У країнах Європи офіційними вважаються 3 види: *T. serpyllum L.* (монографія «Wild Thyme»), *T. vulgaris L.*, *T. zygis L.* (монографія «Thyme») [10].

Діагностичні мікроскопічні та макроскопічні ознаки *T. serpyllum* наведено в [1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Як було зазначено вище, в Україні як один із видів ЛРС застосовується трава *T. serpyllum*, зібрана під час цвітіння, висушена й обмолочена.

Цей вид ЛРС має відхаркувальні, антимікробні, протизапальні, спазмолітичні, заспокійливі та знеболювальні властивості [1, 8, 15] та широко застосовується у вигляді настоїв, відварів, рідкого екстракту при захворюваннях верхніх дихальних шляхів, ларингітах, трахеїтах, бронхітах, бронхопневмоніях, для стиму-

ляції виділення шлункового соку, при розладах нервової системи, головному болю [1, 4, 8, 12, 16, 17]. Також є відомості про радіопротекторні властивості чебрецю повзучого [4]. Із трави одержують ефірну олію, тимол [1, 12]. У народній медицині *T. serpyllum* також використовують для лікування коклюшу, туберкульозу легень, бронхіальної астми, безсоння, алкоголізму, при виразковій хворобі шлунка [12], для лікування дерматитів, запобігання судом тощо [4]. Ефірну олію застосовують при радикулітах і невритах як подразнюючий та зігріваючий засіб, використовують також як антисептичний та вітрогінний засіб [1]. Даний вид ЛРС входить до складу багатьох широко використовуваних препаратів (наприклад, «Пертусин»), лікарських зборів і чаїв [16, 17, 18].

Широкий спектр використання трави чебрецю повзучого зумовлений її хімічним складом. Біологічно активними речовинами (БАР) *T. serpyllum* є компоненти ефірної олії (від 0.3 % до 2.5 %), основні з яких — тимол, карвакрол, тимол, α - і β -пінен, γ -терпінен, α -терпінеол, борнеол та інші терпеноїди [16, 17, 19]. У сировині також містяться флавоноїди, дубильні та гіркі речовини, камедь, терпенові кислоти [16, 20].

В Україні діючою нормативною документацією на даний вид ЛРС є стаття ГФ XI «Трава чабреца», де передбачено стандартизувати даний вид ЛРС за вмістом екстрактивних речовин (не менше 18 %) [9].

У Росії якість трави чебрецю регламентується вимогами ГФ XI та Змінами 1-5 до неї. Регламентація вмісту БАР та методика їх визначення аналогічна зазначеним у статті «Трава чабреца» [9, 15].

Монографія на даний вид ЛРС наявна в Європейській Фармакопеї (ЄФ) [10]. Згідно цієї

монографії, у сировині регламентується вміст ефірної олії (не менше 3.0 мл/кг, у перерахунку на суху сировину).

У Німецькій Фармакопеї для даного виду ЛРС регламентовано вміст ефірної олії (не менше 3 мл/кг) і вміст фенолу, у перерахунку на тимол (не менше 0.1 %) [21].

Якість сировини «Трава чабреца обмолоченная» регламентується ГОСТ за вмістом екстрактивних речовин (не менше 18 %) та ефірної олії (не менше 0.1 %) [22].

Метою даної роботи є дослідження якості використовуваної в Україні ЛРС – висушеної й обмолоченої трави чебрецю повзучого - *Thymus serpyllum* L. – для виявлення можливості гармонізації вимог національної законодавчої бази (ДФУ) із Європейською Фармакопеєю (ЄФ).

Для досягнення даної мети було поставлено такі задачі: провести порівняльний аналіз показників якості сировини, регламентованих монографією ЄФ «Wild thyme» і статтею ГФ XI «Трава чабреца», та дослідити вітчизняну сировину на відповідність вимогам цих документів.

При порівнянні вимог щодо якості трави чебрецю, описаних у ЄФ та ГФ XI, виявлено наступне.

Опис. У ЄФ описані цілі або різані висушені квітучі надземні частини *Thymus serpyllum* L.

У ГФ XI описана зібрана у фазу цвітіння, висушена й обмолочена трава чебрецю повзучого — *Thymus serpyllum* L.

Таким чином, зазначені нормативні документи описують однакову ЛРС, але ЄФ регламентує якість необмолоченої трави, а ГФ XI - обмолоченої.

Макроскопія (Зовнішні ознаки). У статі ГФ наведено метрологічні ознаки для цілих або частково здрібнених листків, шматочків тонких гілочок, квіток. У ЄФ також наводяться ознаки цих частин рослини. Крім того, ЄФ наводить також зовнішні ознаки стебел.

Мікроскопія. У ГФ XI наведено зовнішні ознаки цільної сировини (вигляд із поверхні листка). У ЄФ наведено основні діагностичні характеристики здрібненої на порошок сировини. В обох випадках описано характерні ознаки сировини (будова епідерми листка, діацитний тип продихового апарату, ефіроолійні залозки, покривні волоски).

У ЄФ ідентифікація проводиться також методом тонкошарової хроматографії. На хроматограмі випробовуваного розчину сировини регламентується положення плям тимолу та карвакролу по відношенню до плям речовин порівняння — тимолу та карвакролу.

У ГФ XI будь-які інші методики ідентифікації (крім макроскопії та мікроскопії) відсутні.

Сторонні домішки. ЄФ регламентує вміст сторонніх домішок, визначених у наважці 30 г сировини (у тому числі домішок *Thymus vulgaris* L. і *Thymus zygis* L.).

ГФ XI регламентує вміст шматочків стебел товщиною не більше 0.5 мм (не більше 10 %), вміст органічних (не більше 1 %) та мінеральних (не більше 1 %) домішок.

Як і в ЄФ, у ГФ XI наведено показники «Втрата в масі при висушуванні» («Вологість»), «Загальна зола», «Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті», але нормування різне.

Кількісне визначення. У ГФ XI у траві чебрецю регламентується вміст екстрактивних речовин, що витягаються 30 % спиртом — не менше 18 %. Слід зазначити, що аналогічна методика визначення БАР наявна і у ГОСТ [22] на даний вид ЛРС.

У ЄФ якість сировини визначають згідно вмісту ефірної олії (не менше 3.0 мл/кг, у перерахунку на суху сировину).

Порівняльні дані показників якості трави *Thymus serpyllum* L. за ЄФ і ГФ XI наведено в Табл. 1.

Таким чином, при розробці монографії ДФУ на лікарську рослину сировину *Thymus serpyllum* L. ми повинні враховувати вимоги до кількісного вмісту БАР як ЄФ так і ГФ XI.

Дослідження сировини

В якості об'єктів дослідження були використані зразки трави чебрецю повзучого, зібрані у 2007-2008 рр. у Харківській (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), Луганській (9,10) та Вінницькій (11, 12) областях. Зразки 1-7 — свіжа сировина непромислової заготівлі, зібрана, висушена та що зберігалася відповідно до вимог [23, 24], зразок 8 — зразок сировини непромислової заготівлі (термін зберігання 2 роки), зразки 9-12 — промислові зразки, заготовлені у 2007-2008 роках.

Макроскопічні дослідження показали, що усі зразки сировини за зовнішніми ознаками відповідають вимогам як монографії ЄФ, так і статті ГФ XI. (Табл. 2).

При проведенні мікроскопічних досліджень у всіх зразках були виявлені діагностичні структури, характерні для чебрецю повзучого згідно з вимоги монографії ЄФ та статті ГФ XI (Табл. 2).

Результати аналізу наведених зразків за вмістом сторонніх домішок наведено у Табл. 2. Зразки 1-7 задовольняли вимогам статті ГФ XI за вмістом сторонніх домішок. У зразку 8 було виявлено значне перевищення вмісту органічних домішок, у зразках 9 і 10 — органічних і мінеральної домішок.

При проведенні тесту «Ідентифікація» методом ТШХ, описаним у ЄФ, були використані хроматографічні пластинки Silicagel 60F₂₅₄ на алюмінієвій підложці (Мерк). Відповідно до методики, 1 г здрібненої на порошок сировини струшують із 5 мл метиленхлориду та фільтрують крізь фільтр із натрію сульфатом безводним. Як розчин порівняння використовують розчин тимолу та карвакролу. Виявлення зон, що ідентифікуються, проводять двома способами: спочатку хроматограму переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм, фіксуючи зони поглинання тимолу на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння та 2 зони поглинання на хроматограмі випробовуваного розчину (вище і нижче зони тимолу), потім, після обробки хроматограми розчином анісового альдегіду, фіксуючи дві основні забарвлені зони тимолу та карвакролу на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння.

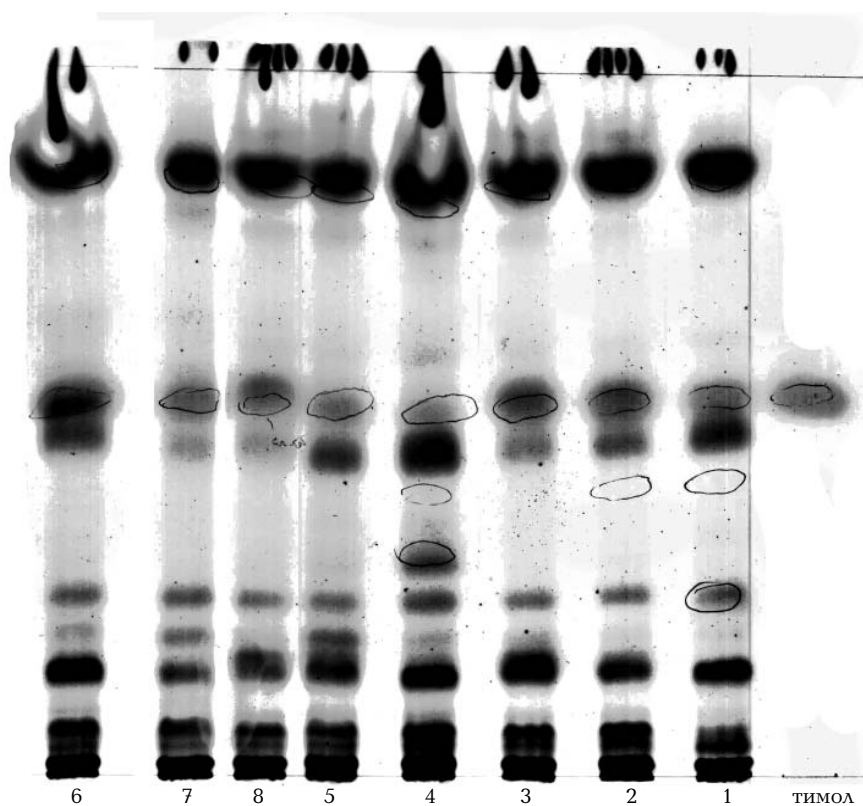
Визначено, що у зразках **1-7** на хроматограмах виявлялися дуже добре виражені регламентовані зони, що відповідають тимолу та карвакролу (типові хроматограми наведено на Рис. 1), а також інші регламентовані зони (зони поглинання). На хроматограмі зразка **8** зони,

що відповідають тимолу та карвакролу, менш чітко виражені. На хроматограмах, що відповідають зразкам **9-12**, регламентовані зони тимолу та карвакролу не виявлено.

Оскільки дані сполуки є основними компонентами ефірної олії чебрецю, отримані результати щодо зразків **9-12** імовірно можна пояснити низьким вмістом ефірної олії у досліджуваних зразках (результати визначення вмісту ефірної олії представлено в Табл. 3).

Щоб оцінити кількісно вміст тимолу та споріднених фенольних сполук у сировині, нами була відтворена методика монографії DAB 10 «Quendelkraut», в якій разом зі вмістом ефірної олії (не менше 3 мл/кг, як і в ЄФ) у траві чебрецю регламентується не менше 0.1 % фенолів, у перерахунку на тимол. Методика заснована на відомій реакції Емерзона [25], що полягає у перетворенні фенолів за допомогою амінопіразолону у присутності окислювача (у даному разі калію гексаціаноферату) у забарвлений продукт конденсації. Визначувані речовини попередньо виділяють із сировини та концентрують їх при отриманні ефірної олії для тесту «Кількісне визначення. Ефірна олія», яку збирають у мірну колбу за допомогою 90 % спирту. Оскільки яскраво-оранжевий продукт конденсації мало

Рисунок 1



Вид хроматограм, отриманих при проведенні ідентифікації сировини за методикою Європейської Фармакопеї

1-8 — випробовувані розчини, отримані зі зразків сировини 1-8.

розчинний у воді, його екстрагують із реакційного середовища тричі хлороформом. За даних умов продукти реакції тимолу та карвакролу за довжини хвилі 450 нм мають дуже близькі значення питомих показників поглинання, тому у сировині оцінюють сумарний вміст фенолів, використовуючи питомий показник поглинання тимолу, що дорівнює 805.

При аналізі зразків **9** та **11** (при хроматографуванні яких у тонкому шарі сорбенту не було виявлено зон тимолу та карвакролу) за даною методикою було визначено вміст фенолів – 0.035 %, що практично у три рази менше ре-

гламентованого. Для перевірки правильності отриманих результатів нами паралельно із розчинами, одержаними із ефірної олії зразків, за даною методикою був проаналізований розчин стандартного зразка тимолу. У результаті були одержані дуже близькі значення вмісту фенолів, у перерахунку на тимол (0.034 %), що свідчить про достовірність отриманих результатів.

Таким чином, у досліджуваних зразках сировини **9** та **11** як вміст ефірної олії, так і вміст фенолів знаходились нижче регламентованих вимог, і це пояснювало відсутність зон тимолу та карвакролу в даних зразках при проведенні

Таблиця 1

Порівняльні дані за числовими показниками та кількісному визначенню трави чебрецю повзучого згідно монографії ЄФ «Wild thyme» та статті ГФ XI «Трава чабреца»

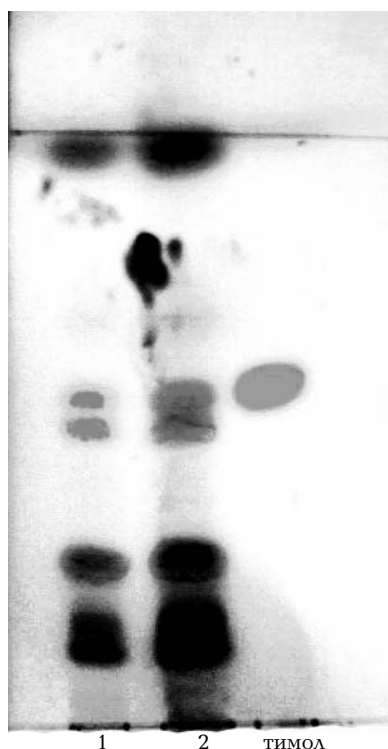
Показник	ГФ XI «Трава чабреца»	ЄФ «Wild thyme»
шматочки стебел товщиною більше 0.5 мм	не більше 10 %	не регламентується
органічні домішки	не більше 1 %	не більше 3 %
мінеральні домішки	не більше 1 %	
втрата в масі при висушуванні (вологість)	не більше 13 %	не більше 10.0 %
загальна зола	не більше 12 %	не більше 10.0 %
зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті	не більше 5 %	не більше 3.0 %
екстрактивні речовини	не менше 18 %	не регламентується
кількісне визначення	не регламентується	не менше 3.0 мл/кг ефірної олії

Таблиця 2

Результати дослідження трави чебрецю повзучого згідно з вимогами ГФ XI

Показник	Нормування	Зразок												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
опис	відповідно до ГФ XI	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
зовнішні ознаки	відповідно до ГФ XI	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
мікроскопія	відповідно до ГФ XI	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
шматочки стебел товщиною більше 0.5 мм	не більше 5 %	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.
органічні домішки	не більше 1 %	0.75	0.9	1	0.5	0.8	0.89	0.65	44	10.5	10.2	10.23	10.23	
мінеральні домішки	не більше 1 %	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	не виявл.	20.	1.7	0.9	1.4	
вологість	не більше 13 %	9.0	8.9	9.3	7.4	8.7	8.8	9.4	8.8	10.	9	9	9	
загальна зола	не більше 12 %	7.3	7.2	5.6	7.6	7.8	7.7	7.8	8.75	16.	7.1	7.1	7.1	
зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті	не більше 5 %	1.9	0.97	0.7	1.3	1.7	1.45	0.7	2.8	11	2.5	3.7	3.2	
екстрактивні речовини	не менше 18 %	24	26	25.5	25	26	24.5	21.4	23	24	27	25	24	

Рисунок 2



Вид хроматограми, отриманої при проведенні ідентифікації сировини за розробленою методикою

1 та 2- випробовувані розчини, отримані зі зразків сировини 12 та 9, відповідно

ідентифікації методом ТШХ. Отримані результати можна пояснити недотриманням належних умов збору та зберігання досліджуваних зразків сировини, але вони також можливо зумовлені саме кліматичними умовами, в яких вирощувалась сировина.

Для того, щоб проводити ідентифікацію такої сировини за наявністю характерних зон тим-

олу та карвакролу, було запропоновано ефірну олію, отриману при проведенні тесту «Кількісне визначення. Ефірна олія», збирати у мірну колбу місткістю 10 мл за допомогою 90 % спирту, потім отриманий розчин використовувати як випробовуваний розчин, що наноситься на пластинку. При хроматографуванні даних розчинів та виявленні плям відповідно до методики ЄФ чітко ідентифікувалися зони тимолу та карвакролу на рівні аналогічних зон на хроматограмі розчину порівняння (рисунок хроматограми представлено на Рис. 2). Крім того, у всіх досліджуваних зразках виявлялися інтенсивні фіолетові зони: одна – у нижній третині хроматограми, інша – вище зони тимолу. Одержаний хроматографічний профіль повністю узгоджувався з описом, наведеним в монографії DAB 10 «Quendelkraut», де також як випробовуваний розчин наносять розчин, одержаний із ефірної олії.

Таким чином, на підставі проведених досліджень, було запропоновано до національної частини монографії «Чебрець повзучий» ввести зауваження, що у разі використання сировини зі вмістом ефірної олії не менше 1.5 мл/кг, ідентифікацію сировини методом ТШХ рекомендується проводити за розробленою методикою. Якщо ж вміст ефірної олії у сировині більше 3 мл/кг, тест «Ідентифікація С» проводять за європейською частиною монографії.

Слід також зазначити, що ЄФ на теперішній час у відповідних комісіях обговорює питання, щодо ідентифікації даного виду ЛРС саме методом ТШХ [26]. Йдеться про можливість внесення змін у вимоги щодо хроматографічного профілю трави чебрецю повзучого.

У Табл. 2 наведено результати аналізу випробовуваних зразків за показниками: «Вологість», «Загальна зола», «Зола, не розчинна

Таблиця 3

Результати аналізу (ідентифікація, кількісне визначення) досліджуваних зразків трави чебрецю повзучого у відповідності до вимог ЄФ

Зразок	Ідентифікація (метод ТШХ)	Вміст ефірної олії (не менше 3.0 мл/кг)
1	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	8.03
2	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	7.56
3	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	8.59
4	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	7.17
5	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	9.91
6	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	13.99
7	виявлені добре виражені зони тимолу та карвакролу	5.69
8	виявлені слабо виражені зони тимолу та карвакролу	3.21
9	зони тимолу та карвакролу не виявлені	1.77
10	зони тимолу та карвакролу не виявлені	1,70
11	зони тимолу та карвакролу не виявлені	1.74
12	зони тимолу та карвакролу не виявлені	1,65

у хлористоводневій кислоті», «Екстрактивні речовини». Як можна побачити з наведених даних, практично усі зразки відповідали регламентованим вимогам. Лише один зразок не відповідав вимогам: у зразку **9** було визначено перевищення вмісту золи, не розчинної у хлористоводневій кислоті (11.2 %, що пов'язано зі значним перевищенням вмісту домішок, в тому числі мінеральних).

За вмістом екстрактивних речовин, що витягаються 30 % спиртом, усі досліджувані зразки відповідали вимогам ГФ XI - вміст екстрактивних речовин в них перевищував 18 %.

Враховуючи те, що при закупівлі трави чебрецю вітчизняними фармпідприємствами вміст екстрактивних речовин є одним із найбільш важливих показників якості сировини, пропонуємо до національної частини монографії ДФУ «Чебрець повзучий» ввести методику визначення екстрактивних речовин, що витягаються 30 % спиртом, із регламентацією ГФ XI – не менше 18 %.

Висновки

Проведений порівняльний аналіз показників якості трави чебрецю відповідно до вимог ЄФ і ГФ XI показав, що у зазначених документах набір показників якості істотно відрізняється. Наявність у монографії ЄФ таких показників як ідентифікація методом ТШХ, кількісне визначення ефірної олії припускають прийняття статті ЄФ до введення до ДФУ.

Проведені дослідження показали, що за такими показниками якості як «Макроскопія», «Мікроскопія» досліджувані серії сировини задовольняли вимогам ЄФ, при проведенні ідентифікації методом ТШХ вони задовольняли вимогам ЄФ при вмісті ефірної олії більше 3 мл/кг і не задовольняли вимогам при вмісті ефірної олії менше 2 мл/кг.

3. При введенні до ДФУ монографії на траву чебрецю до національної частини необхідно включити: вимоги до вмісту ефірної олії - не менше 1.5 мл/кг; при визначенні кількісного вмісту ефірної олії у сировині допустити використання приладу із ціною поділки градуїрованої частини 0.02 мл; за даної регламентації ефірної олії рекомендувати використання розробленої ТШХ-методику ідентифікації сировини; включити методику визначення екстрактивних речовин, що витягаються 30 % спиртом, із регламентацією не менше 18 %.

ЛІТЕРАТУРА

1. Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры. — Харьков: СПДФЛ Мосякин В.Н., 2008. — С. 397-398.
2. Флора европейской части СССР. — Ленинград: Наука, 1978. — Т. III. — С 191.

3. Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. — Ленинград: Наука, 1981. — С 281-284.
4. Мякушко Т.Я., Зинченко Т.В. Определитель лекарственных растений Украины. — К.: Наук. думка, 1982. — С. 79.
5. Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. — Киев: Наук. думка, 1987. — С 311-312.
6. Мінарченко В.М., Тимченко І.А. Атлас лікарських рослин України (хорологія, ресурси та охорона). — Київ: Фітосоціоцентр, 2002. — С. 148-151.
7. Нечитайло В.А., Кучерява Л.Ф. Ботаніка. Вищі рослини. — Київ: Фітосоціоцентр, 2001. — С. 337.
8. Фармацевтична ботаніка. Підручник / Під ред. Л.М. Сірої. — Вінниця: НОВА КНИГА, 2007. — С. 262-263.
9. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — С. 338-339.
10. European Pharmacopoeia. — 6th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2008. — Vol. 2. — 3308 p.
11. Долгова А.А., Ладыгина Е.Я. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии. — М.: Медицина, 1977. - С. 71-73.
12. Терпило Н.И. Анатомический атлас лекарственных растений. — Киев: Государственное медицинское издательство УССР, 1961. — С. 83-85.
13. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие для студ. вузов / Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С. и др. / Под общ. ред Ковалева В.Н. — Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. — С. 286-288.
14. Журбин А.И. Ботаника с основами общей биологии. — М.: Медицина, 1968. — С. 373.
15. Лекарственные растения Государственной Фармакопеи / Под ред. проф. И.А. Самылиной. — М.: АНМИ, 1999. — С. 288-293.
16. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Nirpuridaceae — Lobeliaceae. — Л.: Наука, 1991. — С. 46.
17. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / За ред. проф. В.М. Ковальова. — Х.: Прапор, 2000. — С. 383-384.
18. Перевозченко И.И., Заверуха Б.В., Андриенко Т.Л. Лекарственные растения. — К.: Урожай, 1991. — С. 159-160.
19. Гаммерман А.Ф., Гром И.И. Дикорастущие лекарственные растения СССР. — М.: Медицина, 1976. — 216 с.
20. Котуков Г.Н. Культивируемые и дикорастущие лекарственные растения: Справочник. — Киев: Наукова думка, 1975. — С 101-103.
21. Quendelkraut // DAB 10. 2 Nachtrag. — Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1993.
22. ГОСТ 21816-89. Травя чабреца обмолоченная. — М.: Государственный комитет СССР по управлению качеством продукции и стандартов, 1990. — 5 с.
23. Лекарственные растения Украины / Ивашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Бутенко Л.Т. — Киев: «Урожай», 1972. — 352 с.
24. Справочник по заготовкам лекарственных растений. — 4-е изд. / Ивашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Никольская Л.С. — Киев: «Урожай», 1983. — 296 с.
25. Emerson E. // J.Org.Chem. - 1943. - Vol. 8. - S. 417.
26. Thyme oil. Monograph N: 1374. Concerned also monograph N 865 (Thymi herba) and N 1891 (Serpilli herba). — PA/PH/Exp. 13A/T (09) 35 1 R. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, April 2009.

Резюме

Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Груненко Я.А., Котов А.Г., Вовк А.Г., Тихоненко Т.М.

Вопросы введения в ГФУ монографии «Чебрець повзучий»

Проведен сравнительный анализ показателей качества травы чебреца ползучего в соответствии с требованиями ЕФ и ГФ XI. Наличие в монографии ЕФ таких показателей,

как идентификация методом ТСХ, количественное определение эфирного масла допускает принятие этих методов анализа качества ЛРС в соответствующей монографии ДФУ. Однако, исследованное отечественное растительное сырье не всегда удовлетворяло требованиям монографии ЕФ по содержанию эфирного масла (не менее 3.0 мл/кг) и по хроматографическому профилю. Показана необходимость введения в монографию национальной части с показателем содержания эфирного масла 1.5 мл/кг и идентификацией ЛРС с данным содержанием эфирного масла методом ТШХ. Показана целесообразность введения в национальную часть монографии «Чабрец ползучий» такого показателя качества, как содержание экстрактивных веществ.

Summary

Kotova E.E., Tikhonenko N.I., Grunenko Ya.A., Kotov A.G., Vovk O.G., Tikhonenko T.M.

Matter of introduction into the State Pharmacopoeia of Ukraine of the monograph «Wild Thyme»

Comparative analysis of quality indices of wild thyme herb according to requirements of EP and SP XI was conducted. The presence in the monograph of such indices as identification with the help of HPLC, an assay of essential oil, accepted the adoption of these methods of HD quality analysis into appropriate SPU monograph. However, studied native HD not always confirmed to requirements of EP monograph according to the content of essential oil (not less 3.0 ml/kg) and chromatographic profile. The necessity of the introduction into the monograph of national part with the index of the content of essential oil at the level of 1.5 ml/kg and identification of HD with that content of essential oil by HPLC was shown. The demand of the introduction into national part of the monograph

«Wild Thyme» of such quality index as the content of extractive substances was shown.

Котова Еліна Едуардівна. Закінчила Харківський державний університет (1983). Ст. наук. співр. відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ. К.фарм.н. (2005).

Тихоненко Наталія Ігорівна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2006). Мол. наук. співр. відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

Груненко Яна Анатоліївна. Закінчила коледж НФаУ. Ст. лаборант відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

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

Вовк Олександра Григорівна. Закінчила Харківський державний університет (1959). К.б.н. (1969). Доцент (1973). Ст. наук. співр. групи «Монографії на лікарські субстанції» відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

Тихоненко Тетяна Михайлівна. Закінчила Харківський державний університет (1989) і Національну фармацевтичну академію України. Ст. наук. співр. із наукового напрямку «Монографії на лікарські субстанції» відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ. Відповідальний редактор журналу «Фармаком».

ПРОЕКТ

ЧЕБРЕЦЬ ПОВЗУЧИЙ

Serpylli herba

WILD THYME

Цілі або різані висушені квітучі надземні частини *Thymus serpyllum* L. s.l.

Вміст: не менше 3.0 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на суху сировину.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Стебло дуже розгалужене, до 1.5 мм у діаметрі, циліндричне або невиразно чотиригранне, зелене, червонувате або пурпурове, старі стебла коричневі та здерев'янілі, молоді стебла опушені. Листки супротивні, від 3 мм до 12 мм завдовжки та до 4 мм завширшки, від еліптичної до овально-ланцетної форми із тупою верхівкою, клиноподібною основою, короткочерешкові; край листка цільний, помітно війчастий, особливо біля основи; обидві поверхні більш або менше голі, але виразно плямисті.

Близько від 6 до 12 квіток, зібрані у пазушні півкільця, що утворюють на верхівках гілочок голівкоподібні суцвіття від кулястої до яйцеподібної форми. Чашечка трубчаста, двогуба, верхня губа із 3 зубцями, нижня із 2 зубцями, облямованими довгими волосками; внутрішня поверхня дуже опушена, після цвітіння волоски закривають трубочку чашечки. Віночок від пурпурово-фіолетового до червоного кольору, двогубий, нижня губа складається із 3 лопатей, верхня губа зазубрена, внутрішня поверхня дуже опушена; тичинок 4, прирослих до пелюсток і виступаючих із трубочки віночка.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок від сірувато-зеленого до зеленувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин *хлоральгірату Р*. У порошок виявляються: фрагменти епідерми листка зі звивистими, дещо потовщеними антиклінальними оболонками та продиховими апаратами діацитного типу (2.8.3); численні покривні волоски на обох поверхнях і вздовж країв листка, більшість із яких короткі, конічні, одноклітинні, із потовщеними та бородавчастими оболонками, деякі довгі, однорядні, складаються із до 8 клітин, дещо зду-

ті при з'єднанні, із помірно потовщеними оболонками; численні ефіроолійні залозки із невеликою, округлою, одноклітинною ніжкою та великою кулястою голівкою, що складається із невиразних, розташованих радіально клітин із коричневим вмістом; дрібніші головчасті залозисті волоски із одноклітинною ніжкою та одноклітинною кулястою або яйцеподібною голівкою; пурпурово-фіолетові фрагменти віночка, зовнішня епідерма якого із численними покривними та залозистими волосками, внутрішня епідерма із сосочкоподібних клітин; пилкові зерна від кулястої до еліптичної форми, від 30 мкм до 40 мкм у діаметрі, із дрібнозернистою екзиною та 6 проростковими порами.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5 мл метиленхлориду Р, струшують протягом 3 хв, фільтрують крізь близько 2 г натрію сульфату безводного Р.

Розчин порівняння. 5 мг тимолу Р і 10 мкл карвакролу Р розчиняють у 10 мл метиленхлориду Р.

Пластинка. ТШХ пластинка із шаром силікагелю F₂₅₄ Р.

Рухома фаза: метиленхлорид Р.

Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення А: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати А: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння.

Верхня частина пластинки	
тимол: зона поглинання	чітко виражена зона поглинання зона поглинання (тимол) зони поглинання
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Виявлення В: пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р, використовуючи 10 мл розчину для пластинки площею 200 мм², і на-

гривають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

Результати В: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину у нижній третині можуть виявлятися також інші зони. Інтенсивність зон тимола та карвакролу залежить від випробовуваного зразка (хемотипи).

Верхня частина пластинки	
тимол: коричнювато-рожева зона	коричнювато-рожева зона (тимол)
карвакрол: світло-фіолетова зона	світло-фіолетова зона (карвакрол)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Сторонні домішки (2.8.2). Не більше 3 %, визначення проводять із 30 г сировини.

Сторонні домішки можуть містити листки від голчастих до лінійно-ланцетних із помітно загорнутим краєм, адаксіальна поверхня їх вкрита покривними волосками, що мають вигляд загострених зубчиків із бородавчастими оболонками, на абаксіальній поверхні листків трапляються кілька типів бородавчастих покривних волосків: одноклітинні прямі або дещо зігнуті, двоклітинні або триклітинні, часто колінчасто-зігнуті, та двоклітинні або триклітинні, більш або менш прямі (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*).

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 10.0 %.

Зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті (2.8.1). Не більше 3.0 %.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Проводять визначення вмісту ефірної олії (2.8.12). Використовують 50.0 г різаної сировини, круглодонну колбу місткістю 1000 мл, 500 мл води Р як дистиляційну рідину. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 2 год без ксилолу Р у градуйованій трубіці.

N

Допускається використання сировини із таким нормуванням.

Вміст:

— ефірна олія: не менше 1.5 мл/кг (у перерахунку на суху сировину).

Для сировини із зазначеним вище вмістом ефірної олії ідентифікацію С допускається проводити за наведеною нижче методикою.

С. Випробовуваний розчин. Ефірну олію, одержану у випробуванні «Кількісне визначення», переносять у мірну колбу місткістю 10 мл за допомогою невеликих порцій 96 % спирту Р, обполіскуючи ним градуйовану трубку та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Розчин порівняння. 5 мг тимолу Р і 10 мкл карвакролу Р розчиняють у 10 мл метиленхлориду Р.

Пластинка. ТШХ пластинка із шаром силікагелю F₂₅₄ Р.

Рухома фаза: метиленхлорид Р.

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р, використовуючи 10 мл розчину для пластинки площею 200 мм², і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину у нижній третині можуть виявлятися також інші зони. Інтенсивність зон тимолу та карвакролу залежить від випробовуваного зразка (хемотипи).

Додатково до зазначених вище сторонніх домішок допускається вміст таких сторонніх домішок:

- не більше 10 % шматочків стебел більше 0.5 мм у діаметрі;
- не більше 2 % сторонніх часток.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 13.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

Верхня частина пластинки

	інтенсивна фіолетова зона
тимол: коричнювато-рожева зона	коричнювато-рожева зона (тимол)
карвакрол: світло-фіолетова зона	світло-фіолетова зона (карвакрол)
	інтенсивна фіолетова зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Загальна зола (2.4.16). Не більше 12.0 %.

Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1). Не більше 5.0 %.

При визначенні вмісту ефірної олії допускається використання аналогічних приладів із ціною поділки 0.02 мл.

Випробування, що рекомендується.

Екстрактивні речовини. Не менше 18 %.

Близько 1 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) поміщають у конічну колбу, додають 50 мл спирту (30 % об/об), закривають колбу пробкою, зважують (із похибкою ± 0.01 г), витримують протягом 1 год, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 2 год і охолоджують. Колбу закривають тією самою пробкою, зважують, доводять спиртом (30 % об/об) до початкової маси, перемішують і фільтрують. 25 мл одержаного фільтрату випарюють насухо на водяній бані та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси.

Вміст екстрактивних речовин, у відсотках, у перерахунку на суху сировину, обчислюють за формулою:

$$\frac{m \times 200 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}$$

де:

m — маса сухого залишку, у грамах,

*m*₁ — маса наважки сировини, у грамах,

W — втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Проблеми. Пошук. Рішення.

УДК 615.076:[546.46+546.41]

Меркулова Ю.В., Чайка Л.А., Гомон О.Н.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции»

Роль рН и его коррекция при испытании некоторых лекарственных средств на бактериальные эндотоксины

Приведены результаты экспериментальной разработки процедуры нейтрализации рН с использованием различных коммерческих реактивов лизата амебоцита при условиях проведения испытания методом гель-тромб теста. Определено, что данное средство коррекции рН может быть применено к инфузионным лекарственным средствам, которые назначаются в клинической практике в больших объемах. Установлено, что буферная емкость коммерческих реактивов лизата амебоцитов различных производителей значительно отличается, потому необходима ревалидация методики испытания на бактериальные эндотоксины при замене одного ЛАЛ-реактива другим.

Государственная Фармакопея Украины (ГФУ) предусматривает контроль пирогенной загрязненности лекарственных средств в тесте на пирогены на кроликах или в испытании на содержание бактериальных эндотоксинов [1]. Общая статья 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины» содержит определенные рекомендации относительно условий проведения испытания и, в первую очередь, рН среды, при котором может осуществляться взаимодействие лизата амебоцитов и бактериальных эндотоксинов. Как указано в разделе *Приготовление испытуемого раствора* общей статьи 2.6.14, «...если необходимо, доводят значение рН испытуемого раствора (или полученного из него разведения) таким образом, чтобы значения рН смеси лизата и испытуемого раствора находилось в интервале значений, указанных производителем лизата...» [1]. Следуя Фармакопее, оптимальный диапазон рН определяется фирмой-изготовителем лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) или *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив) и должен быть указан в инструкции, прилагаемой к используемому лизату.

С 1976 года каждая из ведущих американских компаний, производящих лизат, провела комплекс детальных научных исследований, направленных на стандартизацию условий проведения теста и установление допустимого «рабочего» диапазона рН. Лизат амебоцитов, выпускаемый компанией «Associates of Cape Cod, Inc.» (США) под торговым названием «Pyrotell®», имеет оптимум рН в диапазоне от 6.0 до 8.0 [2, 3]. Этот же интервал рН (6.0-8.0) установлен как наиболее приемлемый для лизатов «Pyrotell» («Lonza», США), «Limusate®» («Wa-

ko», США), «Limulus amoebocyte lysate» («Endosafe®», США) [4-6].

За несколько десятилетий применения ЛАЛ-теста на практике накапливался опыт, расширялись и углублялись знания об особенностях ферментативного взаимодействия лизата и эндотоксинов. По мере их накопления закономерно изменялись требования ведущих зарубежных Фармакопей к рН-метрии, существенно отличаясь в редакциях различных Фармакопей.

Впервые появившаяся в Американской Фармакопее в 1980 году общая статья <85> «Bacterial Endotoxins Test» указывала, что рН испытуемого образца должен быть в диапазоне от 6.0 до 7.5 [7]. В первой редакции общей статьи 2.6.14. «Bacterial Endotoxin», включенной в Европейскую Фармакопею в 1993 году, этот диапазон был еще более сужен, составляя 6.5-7.5.

Однако, на практике при проведении испытания аналитику важно соблюдать необходимый диапазон рН не в отдельно взятом испытуемом образце, а в его смеси с лизатом амебоцитов, т.к. именно в этой смеси при взаимодействии лизата с бактериальными эндотоксинами запускается ферментативный каскад реакций, приводящий к коагуляции и образованию геля, наличие которого служит критерием пирогенной загрязненности препарата.

Учитывая этот факт, а также то, что для коммерческих реактивов лизата различных производителей установлены идентичные требования к рН (6.0-8.0), в 1995 году в USP XXIII были внесены редакционные изменения, регламентирующие значения рН в интервале от 6.0 до 8.0 непосредственно в реакционной смеси [8].

Аналогичные уточнения несколько позже включены в текст ныне действующей моно-

графии 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины» Европейской Фармакопеи и в гармонизированной с ней общей статье ГФУ и представлены в следующей редакции: «...обычно, этот интервал для испытуемого образца должен быть от 6.0 до 8.0 единиц рН...» [1, 9]. Такое же требование содержится и в Общей Фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002-00) РФ [10].

Следует отметить, что проведение рН-метрии реакционной смеси представляет определенные технические сложности, т.к. объем смеси (0.2 мл — 0.4 мл) требует использования микроэлектрода, а увеличение объема при сохранении соотношения компонентов смеси приводит к значительному расходованию раствора лизата, относящегося к наиболее дорогостоящим реагентам ЛАЛ-реакции. В то же время, измерение рН испытуемого раствора аналитиком не представляет сложности и является рутинной аналитической процедурой. По-видимому, этим объясняется существующее и по сей день во многих Фармакопеях указание на возможность контроля рН только в испытуемом образце, диапазон которого несколько сужен, что позволяет априори считать оптимальной рН получившейся реакционной смеси.

В своей рекомендательной части общая статья 2.6.14. (раздел 5. *рН смеси*) дает достаточно краткое разъяснение относительно физиологической роли рН в процессах коагуляции: «...оптимальное гелеобразование при взаимодействии лизата амебоцитов и бактериальных эндотоксинов наблюдается при рН 6.0-8.0...» [1]. Научные исследования N. Young и J. Levin, проведенные еще в 1972 году, позволили установить, что скорость реакции лизата с эндотоксинами, как реакции ферментативной, в значительной степени зависит от рН среды. Максимум каталитической активности наблюдается при температуре 37 °С и рН 7.3±0.5, которая и считается оптимальной. Сдвиг рН среды в кислую - до 5.7 или, наоборот, щелочную сторону (до 8.6) приводит к снижению активности ферментов до минимальной [11]. Более поздние исследования J. Levin и S. Nakamura позволили расширить представления о белковых компонентах системы коагуляции и условиях их взаимодействия с эндотоксинами. Обнаружено, что три фермента системы свертывания мечехвоста *Limulus polyphemus* — протеаза N, проактиватор и свертывающий фермент, относящиеся к классу сериновых протеаз, имеют различные оптимумы рН каталитической активности [2, 12-14].

Поскольку значение рН реакционной смеси, выходящее за требуемый диапазон (6.0-8.0), рас-

сматривается фармакопеями как «мешающий фактор» и приводят к ингибированию реакции гелирования, обязательным условием правильного проведения реакции является определение и, при необходимости, коррекция рН до проведения испытания. По мнению Дж. Купера, научного директора компании «Endosafe», неблагоприятные условия рН являются наиболее важной биохимической причиной ингибирования реакции гелирования [15].

В настоящее время существует ряд методологических приемов, направленных на коррекцию рН. Наиболее часто используемый и предпочтительный способ пробоподготовки тестируемого препарата является *разведение его водой для БЭТ* в пределах допустимых величиной МДР (максимально допустимое разведение) или МДК (минимально допустимая концентрация) [1, 15]. Доведение рН можно проводить также с помощью *кислоты, щелочи или подходящего буферного раствора*, в соответствии с рекомендациями производителя лизата [1].

Вместе с тем, следует выделить группу препаратов, рН которых, не соответствуя допустимому диапазону, в то же время не требует особых приемов коррекции на этапе пробоподготовки. К ним относятся препараты воды, инфузионные растворы в больших объемах, парентеральные препараты, рН которых близки к нейтральным, а также некоторые лекарственные средства, не содержащие в своем составе веществ с буферными свойствами. Проблема нейтрализации рН для этой группы препаратов может решаться путем добавления к испытуемому образцу раствора лизата. Выпускаемые в настоящее время лизаты обладают значительной буферной емкостью, что существенно упрощает процедуру доведения рН в испытуемой смеси, даже если нативный раствор лекарственного средства имеет кислую реакцию.

В то же время, в ГФУ отмечено, что добавление лизата к образцу может привести к некоторому снижению рН в смеси [1]. По-видимому, это обусловлено тем, что выпускаемые ЛАЛ-реактивы после восстановления водой для БЭТ имеют рН, близкий к нейтральному.

Совершенно очевидно, что изучение и разработка условий коррекции рН в испытуемых образцах при проведении теста «Бактериальные эндотоксины» является важным условием стандартизации методик контроля пирогенной загрязненности препаратов и повышения их надежности.

В лаборатории фармакопейного анализа ГП УНФЦКАС проведены исследования, направленные на изучение мешающего действия

pH на реакцию лизата амебоцитов с бактериальными эндотоксинами и разработаны способы коррекции pH в условиях проведения испытания гель-тромб методом.

Целью настоящей работы является разработка процедуры нейтрализации pH раствором лизата с использованием ЛАЛ-реактивов различных производителей, а также определение группы лекарственных средств, для которых данный способ коррекции pH применим.

Материалы и методы

При выборе объектов исследования исходили из следующих критериев:

- лекарственное средство применяется парентерально инфузионно в больших объемах;
- регламентируемый в АНД диапазон pH лекарственного препарата выходит за пределы физиологического (6.0-8.0);
- препарат не содержит в своем составе веществ с буферными свойствами, что позволяет предположить возможность коррекции pH испытуемого образца раствором лизата.

Исходя из указанных критериев, в исследование включили растворы для инфузий натрия хлорида, глюкозы, неогемодеза, декстрана 40 и гидроксиэтилкрахмала. Данные инфузионные растворы применяют в качестве препаратов кровозамещающей терапии и растворителей внутривенно в максимальной дозе до (0.5-3) л в сутки.

В качестве исследуемых образцов использовали следующие препараты:

- Натрия хлорид, в виде 0.9 % раствора для инфузий, содержащий 0.9 г натрия хлорида в 100 мл воды для инъекций. Показатель pH регламентируется в диапазоне 5.0-7.5.
- Глюкоза, в виде 5 % раствора для инфузий, содержащий 5.0 г глюкозы в 100 мл; вспомогательные вещества - натрия хлорид, кислота хлористоводородная, вода для инъекций. Показатель pH регламентируется в диапазоне 4.0-6.5.
- Неогемодез, раствор для инфузий, содержащий 6.0 г поливинилпирролидона низкомолекулярного, 0.55 г натрия хлорида, 0.042 г калия хлорида, 0.05 г кальция хлорида, 0.0005 г магния хлорида безводного, 0.023 г натрия гидрокарбоната в 100 мл воды для инъекций. Показатель pH регламентируется в диапазоне 5.2-7.0.
- Реополиглюкин, раствор для инфузий, содержащий в 100 мл 10.0 г декстрана 40 и вспомогательные вещества — натрия хлорид, вода для инъекций. Показатель pH регламентируется в диапазоне 4.0-6.5.

— ХАЕС-стерил, 10 % раствор для инфузий, содержащий 10.0 г гидроксиэтилкрахмала, 0.9 г натрия хлорида в 100 мл воды для инъекций. Показатель pH регламентируется в диапазоне 3.5-6.0.

Определение pH проводили потенциометрически с использованием pH-метра «pH 713» («Metrohm», Швейцария). Измеряли pH нативных и разведенных растворов препаратов и их смесей с раствором лизата в соотношении, эквивалентном соотношению данных растворов в испытуемой пробе при проведении ЛАЛ-теста гель-тромб методом (метод А, предельный тест). Согласно рекомендациям производителей лизата соотношение раствора лизата и раствора препарата в образце составляло соответственно 1:1 [4-6, 16]. Все разведения проведены с применением воды для БЭТ («Associates of Cape Cod., Inc.», США).

В качестве лизата амебоцитов использовали все 4 из ныне выпускаемых ЛАЛ-реактивов для гель-тромб теста, сертифицированных для фармакопейного анализа: «Pyrotell®» («Associates of Cape Cod., Inc.», США), «Pyrogent» («Lonza», США), «Limusate®» («Wako», США) и «Limulus amoebocyte lysate» («Endosafe®», США) [4-6, 16]. Растворы лизатов амебоцитов готовили и хранили согласно инструкций производителей [4-6, 16].

Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе исследований определяли pH нативных растворов исследуемых препаратов. Как видно из Табл. 1, все исследуемые образцы лекарственных средств полностью соответствуют требованиям АНД по показателю «pH», значения которых, находясь в регламентируемом диапазоне, приближались к нижней границе. Как известно, кислотная и даже слабкокислотная среда растворов является серьезным препятствием для взаимодействия лизата амебоцитов и бактериальных эндотоксинов и расценивается как мешающий фактор при проведении ЛАЛ-теста [1, 11].

Следующий этап исследований был направлен на определение коэффициента разведения препарата, позволяющего получить раствор с pH в рекомендуемом фармакопеями интервале от 6.0 до 8.0.

Согласно данным Табл. 1, при последовательном 2-кратном разведении водой для БЭТ pH полученных разведенных растворов исследуемых препаратов постепенно нормализуется до физиологического уровня, который является оптимальным для ферментативных процессов гелеобразования [1, 2, 11-14].

Установлено, что для растворов Натрия хлорида 0.9 % и Глюкозы 5 % достаточно разведения в 2 раза (коэффициент разведения 1:2), чтобы получить растворы, значение рН которых приближается к нейтральному (6.40 и 6.43, соответственно) и лежит в рекомендуемом ГФУ интервале 6.0-8.0.

Для растворов неогемодеза, декстрана 40 и гидроксизтилкрахмала 10 % требуется еще один шаг 2-х кратных разведений водой для БЭТ (коэффициент разведения 1:4), в результате которого рН полученных растворов смещается в оптимальную для реакции свертывания область (Табл. 1). Таким образом, разведение в 4 раза позволяет получить разведенные растворы неогемодеза, декстрана 40 и гидроксизтилкрахмала 10 %, рН которых находится в рекомендуемом диапазоне от 6.0 до 8.0, и, следовательно, не является мешающим фактором для процессов гелеобразования [1].

С целью изучения буферной мощности различных ЛАЛ-реактивов и возможности их использования для коррекции рН образца при проведении испытания на бактериальные эндотоксины проведены сравнительные экспериментальные исследования, результаты которых представлены в Табл. 2.

Как видно из Табл. 2, добавление любого из 4-х использованных ЛАЛ-реактивов (сертифицированных для фармакопейного контроля качества) к нативным инфузионным растворам позволяет получить реакцию смеси с необходимым рН, лежащим в области требуемых фармакопейных значений [1, 4-6, 8, 9, 16].

Однако, несмотря на однонаправленность рН-корректирующих эффектов различных растворов

лизата амёбоцитов, выявились существенные различия в силе их буферного действия.

Добавление ЛАЛ-реактива «Pyrogent» («Lonza», США) к исследуемым инфузионным препаратам характеризуется резким увеличением рН, значения которого находятся в слабощелочной области. Так, рН смесей «Pyrogent» с Натрия хлоридом 0.9 % — 7.61, с Глюкозой 5 % — 7.69, с Неогемодезом — 7.35, с Реополиглюкином — 7.55, с ХАЕС-стерилом 10 % — 7.73 (Табл. 2).

Практически так же, несущественно слабее, проявляются буферные свойства ЛАЛ-реактива фирмы «Wako» (США), «Limusate®», добавление которого приводит к значительному смещению водородного показателя смеси, значение которого, превышая 7.0, определяется в интервале 7.04-7.62 (Табл. 2).

ЛАЛ-реактив «Limulus amoebocyte lysate», выпускаемый «Endosafe®» (США), продемонстрировал способность изменять кислотно-основное состояние реакционной смеси, приближая его к нейтральному (7.0). При этом для смеси с Неогемодезом значение рН располагалось в слабокислой среде — 6.83, тогда как, для смесей с Натрия хлоридом 0.9 %, Глюкозой 5 %, Реополиглюкином и с ХАЕС-стерилом 10 % зарегистрированы практически идентичные значения водородного показателя на уровне 7.28-7.34 в слабощелочной области. Следует отметить, что такая однонаправленность и количественная равновыраженность рН-корректирующего действия «Limulus amoebocyte lysate» наблюдалась, несмотря на существенные различия в исходных значениях рН препаратов. По мнению специалистов компании «Endosafe®», выпускаемый ими лизат характеризуется наибольшей

Таблица 1

Определение рН нативных и разведенных растворов препаратов

Препарат	Коэффициент разведения препарата	рН раствора препарата
Натрия хлорид 0.9 %	1:1*	5.34
	1:2	6.40
Глюкоза 5 %	1:1	5.01
	1:2	6.43
Неогемодез	1:1	5.43
	1:2	5.87
	1:4	6.05
Реополиглюктн	1:1	5.04
	1:2	5.45
	1:4	6.32
ХАЕС-стерил 10 %	1:1	4.73
	1:2	5.78
	1:4	6.34

Примечание.

* — нативный раствор препарата.

буферной емкостью за счет большого количества буферных агентов, включенных в состав прописи, что практически сводит к минимуму проблемность фактора рН при проведении рутинного контроля препаратов [15]. Примером уникальных возможностей данного лизата является его способность тестировать образцы, содержащие 0.01 моль/мл натрия гидроксида, без предварительной пробоподготовки последнего [15].

Полученные результаты и вышеприведенные данные литературы позволяют предположить, что в результате добавления «Limulus amoebocyte lysate» к нативным растворам для инфузий, рН полученных смесей будут максимально приближены к нейтральному (7.0).

Как видно из Табл. 2, добавление «Pyrotell®» (фирма «Associates of Cape Cod, Inc.», США), устраняет мешающее действие кислотной среды, плавно смещая водородный показатель в слабокислую сторону. рН полученных смесей

лизата с нативными растворами испытуемых препаратов находится в интервале от 6.13 до 6.56, что полностью соответствует требованиям ГФУ к рН реакционной смеси [1]. Свойство «Pyrotell®» нормализовать рН до значений 6.0 - 7.0, в отличие от других реактив, которые доводят рН до значений 7.0 - 8.0, — до слабощелочной, по-видимому, объясняется тем, что рН-корректирующее действие данного ЛАЛ-реактива направлено к области значений 6.3-6.4, которые присущи самому раствору Pyrotell® после восстановления его водой для БЭТ [2].

Таким образом, представленные исследования позволили экспериментально оценить и уточнить один важных методологических приемов коррекции рН, который, наряду с известными и описанными (разведение водой для БЭТ, использование буферов, буферной воды, кислот или оснований), позволяет решить проблему рН-мешающего действия в ЛАЛ-тесте.

Таблица 2

Определение рН реакционной смеси раствора лизата амёбоцитов и нативного раствора препарата (в соотношении 1:1)

Растворы лизата амёбоцитов	рН
<i>Натрия хлорид 0.9 %</i>	
—	5.34
Pyrotell® («As. Cape Cod»)	6.43
Pyrogent («Lonza»)	7.61
Limusate® («Wako»)	7.55
Limulus amoebocyte lysate («Endosafe»)	7.29
<i>Глюкоза 5 %</i>	
—	5.01
Pyrotell® («As. Cape Cod»)	6.56
Pyrogent («Lonza»)	7.69
Limusate® («Wako»)	7.62
Limulus amoebocyte lysate («Endosafe»)	7.28
<i>Неогемогез</i>	
—	5.43
Pyrotell® («As. Cape Cod»)	6.13
Pyrogent («Lonza»)	7.35
Limusate® («Wako»)	7.04
Limulus amoebocyte lysate («Endosafe»)	6.83
<i>Реополиглюкин</i>	
—	5.04
Pyrotell® («As. Cape Cod»)	6.43
Pyrogent («Lonza»)	7.55
Limusate® («Wako»)	7.52
Limulus amoebocyte lysate («Endosafe»)	7.28
<i>ХАЕС-стерил 10 %</i>	
—	4.73
Pyrotell® («As. Cape Cod»)	6.40
Pyrogent («Lonza»)	7.73
Limusate® («Wako»)	7.59
Limulus amoebocyte lysate («Endosafe»)	7.34

Выводы

1. Добавление раствора лизата амебоцитов к испытываемому образцу является одним из способов коррекции рН реакционной смеси при проведении испытания на бактериальные эндотоксины.

Добавление раствора лизата позволяет полностью нормализовать рН испытываемого образца до значений, находящихся в рамках фармакопейных требований, без каких-либо дополнительных процедур.

Добавление раствора лизата позволяет решить проблему коррекции рН при испытании инфузионных лекарственных средств, назначаемых в больших объемах.

Буферная емкость коммерческих реактивов лизата амебоцитов различных производителей значительно отличается, что диктует необходимость ревалидации методики испытания при переходе от одного ЛАЛ-реактива к другому.

Несмотря на то, что добавление раствора лизата позволяет нормализовать рН даже нативных растворов препаратов, устраняя его мешающее действие, однако, на практике при осуществлении рутинного контроля необходимо и целесообразно провести ряд разведений водой для БЭТ (в пределах допустимых величиной МДР или МДК), предотвращая влияние иных «мешающих факторов».

ЛИТЕРАТУРА

- 2.6.14. Бактериальні ендотоксини / Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. - Харків: «Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 115-125.
- Gould M.J. Pyrosol® Reconstitution Buffer // LAL Update. 1989. – Vol. 7, № 3. – P. 1-2.
- Sullivan J.D., Valois F.W., Watson F.W. Endotoxins: the Limulus lysate system // Mechanism in Bacterial Toxinology. - New York.: John Wiley & Sons, 1976. – P. 218-236.
- Multi-test Limulus Amebocyte Lysate Pyrogen Plus: US Lisence No. 709 - Lonza Walkersville, Inc., 2006. – 4 p.
- Lymusate ® (Limulus Amebocyte Lysate): U.S.A. License No. 852: Direction for use. - 2006. – 4 p.
- Multi-test vial for endotoxin (pyrogen) detection // Limulus amebocyte lysate Endosafe® KTA™: U.S. License No. 1197. – 2 p.
- <85> Bacterial Endotoxins Test // The United States Pharmacopoeia. USP-XX, Twentieth Revision. - 15th ed. – Rockville, 1980. - P.888-889.
- <85> Bacterial Endotoxins Test // The United States Pharmacopoeia USP-XXIII, NF 18. - Rockville, 1995. - P. 1696-1697.
- 2.6.14. Bacterial endotoxins / European Pharmacopoeia. - 5.1st ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2004. – P. 145-147.
- 42-0002-00. Бактериальные эндотоксины. Общая фармакопейная статья. – 10 с.
- Young N.S., Levin J., Prendergast R.A. An invertebrate coagulation activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation // J. Clin. Invest. - 1972. – № 51. – P. 1790-1797.
- Nakamura S., Levin J. Fractionation of Limulus amebocyte lysate. Characterization of activation of the proclotting enzyme by an endotoxin-mediated activator // Biochim. Biophys. Acta. - 1982. – № 704. – P. 217-225.
- Nakamura S., Levin J. Endotoxin-mediated Limulus proclotting enzyme activator and the detection of a previously undescribed protease (protease N) // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1982. – № 108. – P. 1619-1623.
- Dawson M.E. Preliminary Testing // LAL Update. – 1996. - Vol. 14, № 1. – P. 1-4.
- Cooper J.F. Solving pH interference problems with Endosafe® reagents // LAL Times. - 1997. – Vol. 3, № 3. – P. 1-3.
- Limulus Amebocyte Lysate. Pyrotell®. - Associates of Cape Cod Incorporated, 2001. – 2 p.

Резюме

Меркулова Ю.В., Чайка Л.О., Гомон О.М.

Роль рН та його корекція при випробуванні деяких лікарських засобів на бактеріальні ендотоксини

Наведено результати експериментальної розробки процедури нейтралізації рН із використанням різних комерційних реактивів лізату амебоциту за умов проведення випробування методом гель-тромб тесту. Визначено, що даний засіб корекції рН може бути застосований до інфузійних лікарських засобів, що призначають у клінічній практиці у великих об'ємах. Встановлено, що буферна ємність комерційних реактивів лізату амебоцитів різних виробників значно відрізняється, тому необхідна ревалідація методики випробування на бактеріальні ендотоксини при заміні одного ЛАЛ-реактиву іншим.

Summary

Merkulova Yu.V., Chayka L.A., Gomon O.N.

Role of pH and its correction in the test of some drugs on bacterial endotoxines

Data of experimental development of the method of pH neutralization with the use of different commercial reagents of amoebocytes' lysate under the conditions of the conduction of the test by the method of gel – thrombus test were given. It was determined that this drug for the pH correction could be used for infusion drugs, which were prescribed in clinical practice in large volumes. It was established that buffer capacity of commercial reagents of amoebocytes' lysate of different manufacturers had constitutive differences. Therefore it was necessary to conduct revalidation of the method of the test on bacterial endotoxins at the change of one LAL-reagent to the other.

Меркулова Юлія Вадимівна. Ст. науч. сотр. лабораторії фармакопейного аналізу ГП УНФЦКЛС (2003). Ст. науч. сотр. лабораторії загальної фармакології ГП ГНЦЛС (2002). К.б.н (2002).

Чайка Леонід Александрович. Зав. лабораторією загальної фармакології ГП ГНЦЛС (1990). К.мед.н. (1981).

Гомон Ольга Николаевна. Ст. науч. сотр. лабораторії фармакопейного аналізу ГП УНФЦКЛС (1997). К.б.н. (1997).

Фітохімічні дослідження

УДК 615. 07:582.942.2

Попова Н.В., Литвиненко В.И.

Национальный фармацевтический университет

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции»

Вопросы стандартизации лекарственного растительного сырья – мелиссы листьев

Проведен анализ отечественного лекарственного растительного сырья – мелиссы листьев на соответствие требованиям монографии Европейской Фармакопеи «Melissa leaf». Показано, что отечественные образцы листьев мелиссы соответствуют требованиям ЕФ как по макроскопическим, микроскопическим характеристикам и идентификации методом ТСХ, так и по количественному содержанию кислоты розмариновой.

Мелисса (*Melissa*) — род растений семейства *Lamiaceae*, который включает, по данным разных авторов, от 3 до 10 видов. Наиболее используемый вид в Европе, и в том числе в Украине — мелисса лекарственная (лимонная мята) *Melissa officinalis* L., хотя во многих европейских странах используют *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* u *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. et Smith) Arcang. Для медицинских целей в России и в Украине чаще заготавливают растительное сырье от культивируемого растения, распространены в культуре сорта мелиссы — Эрфуртская прямостоячая и Кведлибургская стелющаяся [1, 2, 8, 15, 19].

Прародиной мелиссы считают восточный район Средиземноморья до Персии, области Черного моря и Передней Азии. В диком виде произрастает в Средней и Южной Европе, на Балканах, в Иране, Северной Африке, Северной Америке, в Украине, Кавказе. Средней Азии. Культивируют лимонную мяту во многих странах, в том числе в Украине, России, странах Прибалтики [1, 2, 8, 15, 19].

Мелисса лекарственная — одно из популярных, издавна используемых лекарственных растений. На фармацевтическом рынке Европы известно более 300 препаратов на основе мелиссы, которые оказывают седативное, легкое снотворное действие; известны противомикробные и антисептические эффекты мелиссы. В последнее время мелисса лекарственная привлекает внимание благодаря установленному противогерпетическому действию [3, 4, 8, 17, 18, 19].

Биологическая активность мелиссы обусловлена комплексом эфирного масла и фенольных соединений, что нашло свое отражение и в фармакопейных требованиях к качеству сырья мелиссы. Химический состав представлен следующими классами соединений: терпено-

иды (цитраль, цитронеллаль, гераниол, гераниаль и другие терпеноиды эфирного масла), а также сапонины (урсоловая и олеаноловая кислоты), фенольные соединения, среди которых производные коричной кислоты, флавоноиды (гликозиды лютеолина и апигенина). [3, 4, 8, 15, 20, 24, 25].

В листьях мелиссы содержатся производные коричной кислоты (депсиноиды, димеры, тримеры): кофейная кислота, розмариновая кислота, мелитриновые кислоты А и В, а также хлорогеновая кислота. Кроме того, листья мелиссы содержат *n*-кумаровую, феруловую, *n*-гидроксibenзойную, протокатеховую, гентизовую, синаповую, сиригиновую, ванилиновую и салициловую кислоты [3, 4, 5, 6, 7]. Установлено, что максимальное количество кислоты розмариновой (3.9 %) накапливается в сырье в период массового цветения мелиссы [5, 6, 7, 16, 19, 20, 24].

Эфирное масло мелиссы лекарственной обуславливает специфический лимонный аромат, который сравнительно быстро исчезает. Установлено, что запах обусловлен цитралем и цитронеллалем. Выход эфирного масла мелиссы лекарственной зависит от места произрастания, времени заготовки, метода сушки, сортовых характеристик, возраста растения и других факторов. Установлено, что при произрастании в затененных местах выход масла снижается значительно. По данным чешских исследователей, содержание эфирного масла в верхней трети травы составляет 0.13 %, в средней и нижней трети (при совместном определении) — 0.08 %, во всей массе травы — 0.06 %. Соответственно, в листьях тех же образцов диапазон содержания эфирного масла составил (0.39-0.44) %. Состав эфирного масла представлен следующими терпеноидами: цитраль (а) или нераль, гераниаль или цитраль (в), цитронеллаль, гераниол,

β -пинен, α -пинен, кариофиллен-оксид, α - и β -кариофиллен и др. Неустойчивость запаха, вероятно, объясняется нестабильностью терпеноидов — альдегидов: цитраль (а) или нераль, гераниаль или цитраль (в). По мнению ряда авторов, соотношение нералья и гераниаля (3:4) и наличие 6-метил-5-гептен-2-она являются критериями идентификации масла мелиссы. Другие авторы выделяют еще один специфический компонент — β -кариофиллен [8, 9, 10, 13, 14, 15].

Спектр терапевтического действия препаратов мелиссы обусловлен терпеноидами (эфирное масло, сапонины) и суммой фенольных соединений (фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, кумарины). Выраженный седативный эффект описан для эфирного масла (цитронеллаль, цитраль, гераниаль и др.), а спазмолитический — для гераниола и цитронеллола. Для фенольных соединений мелиссы характерны противовирусная, иммуномодулирующая, антигистаминная, антиоксидантная и антимикробная активности [3, 4, 8, 17, 18].

Экстракты листа применяют как эффективное седативное средство. Препараты мелиссы назначают при состояниях общего нервного возбуждения, истерии, вегетососудистой дистонии, бессоннице, мигрени, функциональных болях в сердце, тахикардии, нарушениях сердечного ритма и изменениях артериального давления под влиянием эмоциональных фак-

торов, атеросклерозе, головокружении, шуме в ушах, болезненных менструациях, послеродовой слабости.

На фармацевтическом рынке Украины известны отвары, чай из травы и фильтр-пакет мелиссы лекарственной, а также зарубежные препараты: «Ново-пассит», «Персен», «Нерво-флюкс» в состав которых входит сухой экстракт мелиссы, и др.

Эфирное масло мелиссы входит в состав бальзама и линимента «Санитас» (вместе с метилсалицилатом, терпентинным маслом очищенным, эвкалиптовым маслом и камфорой), которые обладают успокоительным действием [3, 4, 15].

Наружно мелиссу назначают для ванн и компрессов при аллергических дерматозах, фурункулезе, а также в косметологии. В стоматологической практике ее применяют для полоскания ротовой полости при гингивитах. Мелиссовый спирт назначают наружно для втираний при невралгиях, головных болях, мигрени, а также вечером перед сном при бессоннице.

Качество листьев мелиссы регламентируют Европейская Фармакопея, фармакопеи Италии, Франции, Венгрии, Германии, Британская травяная фармакопея (БТФ). Согласно требованиям Европейской Фармакопеи сырье должно содержать не менее 1.0 % розмариновой кислоты, Фармакопеи Франции — не менее 6 % суммы гидроксикоричных кислот, в пересчете на

Таблица 1

Нормативные требования к качеству листа мелиссы

Нормативный документ	Содержание действующих веществ	Ощая зола	Потеря в массе при высушивании	Примеси	Качественный анализ
Европейская Фармакопея	не менее 1.0 % кислоты розмариновой	не более 12 %	не более 10 %	не более 10 % стеблей диаметром более 1 мм и не более 2 % другой примеси (навеска 20 г)	ТСХ анализ эфирного масла
Британская травяная Фармакопея	15.0 % экстрактивных веществ, извлекаемых водой	не более 14.0 %	—	не более 2 % посторонних примесей	ТСХ анализ фенольных соединений
Фармакопея Австрии	не менее 0.05 % эфирного масла	не более 12 %	—	не более 3 % посторонних примесей	—
Фармакопея Германии	не менее 0.05 % эфирного масла	не более 12 %	не более 12 %	не более 3 % посторонних примесей	ТСХ анализ эфирного масла

кислоту розмариновую. Согласно требованиям БТФ содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, должно быть не менее 15 % [28]. Фармакопеи Австрии и Германии регламентируют содержание эфирного масла не менее 0.05 % [8, 21, 27]. В Украине используют траву Melissa лекарственной, качество которой регламентирует ФС 42-3645-98 по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 24 % спиртом [15, 23].

Сравнительный анализ показателей качества для листа Melissa лекарственной в некоторых нормативных документах приведен в Табл. 1.

Целью настоящей работы является исследование показателей качества отечественных образцов листьев Melissa лекарственной на соответствие требованиям Европейской Фармакопеи.

Исследования сырья

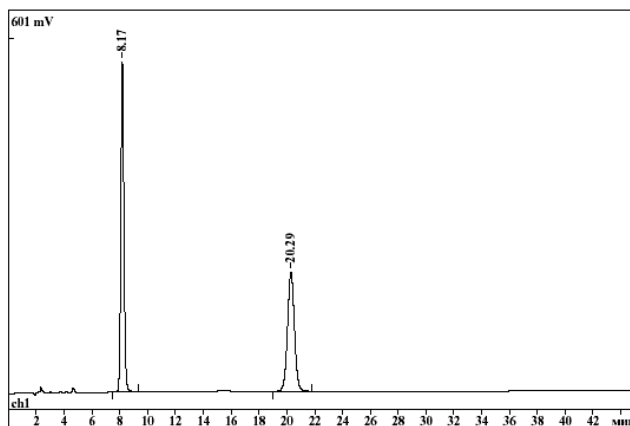
В предыдущих работах рассмотрены некоторые вопросы возможности гармонизации национальной законодательной базы для Melissa лекарственной с требованиями Европейской Фармакопеи [11, 12, 13, 20].

Образцы листьев Melissa лекарственной были заготовлены во время цветения на фармакопейном участке ботанического сада НФаУ, выращены и заготовлены в Дергачевском районе Харьковской области, г. Джанкой (Крым), на Крымской ОСЛР, а также предоставлены Житомирским ЗАО «Лектравы».

Макроскопия (Внешние признаки). Исследуемые образцы соответствуют требованиям ЕФ.

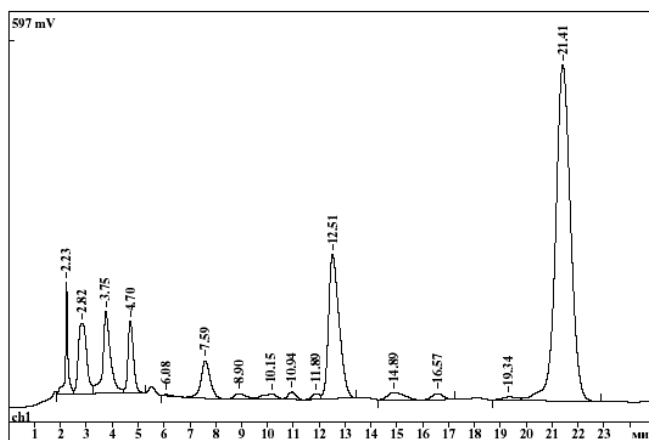
Микроскопия. Анализ анатомических характеристик отечественного сырья показал, что они соответствуют приведенным в ЕФ требованиям.

Рисунок 1



Хроматограмма веществ сравнения: феруловой (1) и розмариновой (2) кислот

Рисунок 2



Хроматограмма, полученная в условиях количественного определения кислоты розмариновой в листьях Melissa (по методике ЕФ)

2 — розмариновая кислота

Идентификация. Метод тонкослойной хроматографии. Европейская Фармакопея рекомендует проводить хроматографический анализ эфирного масла мелиссы в тонком слое сорбента; подвижная фаза: этилацетат - гексан (10:90), вещества сравнения — цитронеллаль и цитраль. Реактив для обнаружения компонентов масла — раствор анисового альдегида, после хроматографирования, высушивания и опрыскивания реактивом, пластинку нагревают при температуре (100-105) °С. На хроматограмме должны обнаруживаться зоны цитронеллала и цитраля.

На хроматограмме исследуемых образцов листьев мелиссы обнаруживается несколько основных пятен, одно из которых совпадало с пятном цитронеллала на хроматограмме раствора сравнения, а пятно, соответствующее цитралю, показало, что данный компонент содержится в эфирном масле исследуемых образцов в следовых количествах. То есть, основным компонентом эфирного масла является цитронеллаль [13].

ВЭЖХ анализ позволил установить, что эфирное масло отечественных образцов листьев мелиссы содержит следовые количества цитраля, и характеризуется высоким содержанием цитронеллала, гераниола и цитронелола [13].

Количественное определение ЕФ регламентирует содержание в листьях мелиссы не менее 1.0 % кислоты розмариновой.

Анализ содержания кислоты розмариновой проводили методом ВЭЖХ в соответствии с методикой, приведенной в ЕФ [21]. Данная методика была воспроизведена на жидкостном хроматографе фирмы «Waters» с ручным инжектором Rheodyne 7725, с дальнейшей компьютерной обработкой результатов исследования, с использованием программы «Мультихром для Windows». Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «Waters 2487», длина волны 320 нм. Хроматографическая колонка Symmetry Shield, размер 4.6 мм × 250 мм.

Результаты исследования приведены на Рис. 1 и 2 и в Табл. 5.

Таким образом, содержание розмариновой кислоты в исследованных отечественных образцах листа мелиссы находится в пределах от 1.37 % до 3.40 %, что соответствует нормированию ЕФ.

Испытания на чистоту. В ЕФ для листьев мелиссы приведены показатели «Общая зола», «Потеря в массе при высушивании» и «Посторонние примеси».

Анализ отечественных образцов листьев мелиссы по указанным выше показателям проводили в соответствии с требованиями [21, 22, 22a]. Результаты приведены в Табл. 3.

Выводы

Проведенный анализ показал, что в ведущих Фармакопеях лекарственное растительное сырье — листья мелиссы стандартизуют по содержанию эфирного масла, экстрактивных веществ и розмариновой кислоты.

2. Исследованное отечественное лекарственное сырье соответствует по качеству требованиям Европейской Фармакопеи как по макроскопическим, микроскопическим характеристикам и идентификации методом ТСХ, так и по количественному содержанию кислоты розмариновой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. - СПб.: «Мир и семья», 1995. - 990 с.
2. Определитель высших растений Украины. / Под ред. Ю.М. Прокудина. - К: Наук. думка, 1987. - 546 с.
3. Зузук Б. М. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.): Аналитический обзор / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик // Провизор. - 2002. - № 2. - С. 21-25.
4. Зузук Б.М. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик // Провизор. - 2002. - № 1. - С. 36-39.
5. Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry*. - 2003. - Vol. 62. - P. 121 - 125.
6. Rosmarinic acid - an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) / Toth J., Mrlanova M., Tekelova D., Korenova M. // *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana*. - 2003. - Vol. 50. - P. 139-146.
7. Melitric acids A and B, new trimeric caffeic acid derivatives from *Melissa officinalis*. / Agata I., Kusakabe H., Hatano T., Nishibe S., Okuda T. // *Chem. Pharm. Bull.* - 1993. - Vol. 41. - P. 1608-1611.

Таблица 2

Результаты количественного анализа листа и травы мелиссы лекарственной

Номер образца	Образец	Содержание розмариновой кислоты, % (не менее 1.0 % по ЕФ)
1.	листья мелиссы, Крым	2.80
2.	листья мелиссы, Джанкой	1.37
3.	листья мелиссы, Дергачевский район	1.91
4.	листья мелиссы, серия 51007	3.08
5.	листья мелиссы, серия 10108	3.10
6.	листья мелиссы, серия 91008	3.40

Таблица 3

Анализ листьев мелиссы по показателям «Общая зола», «Потеря в массе при высушивании» и «Посторонние примеси» Европейской Фармакопеи

Образец	Показатель		
	Общая зола, % (не более 12.0 %)	потеря в массе при высушивании, % (не более 10.0 %)	посторонние примеси (сумма примесей, %) (не более 10 % стеблей более 1 мм диаметром, не более 2 % других посторонних примесей)
листья мелиссы, Крым	8.07	5.60	2.20
листья мелиссы, Джанкой	8.50	6.94	3.00
листья мелиссы, Дергачевский район	6.48	6.74	3.87
листья мелиссы, серия 51007	8.80	9.00	3.60
листья мелиссы, серия 91008	9.08	5.80	2.90
листья мелиссы, серия 10108	8.11	5.10	3.10

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

9. Bagdat R.B. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields // J. of Fac. of Agric. — 2006. - Vol. 216, № 1. - P. 116-121.

10. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea / Carnat A.P., Carnat A, Fraisse D., Lamaison J.L. // Pharmaceutica Acta Helveticae. — 1998. - Vol. 72 - P. 301-305.

11. Морфолого-анатомическая стандартизация травы мелиссы / Попова Н.В., Литвиненко В.И., Кичимасова Я.С., Картмазова Л.С. // Фармаком. — 2008. - № 2. - С. 45-51.

12. Попова Н.В. Анализ мелиссы лекарственной и котоника кошачьего/ Попова Н.В., Литвиненко В.И., Бовтенко В.А. // Фармаком. — 2008. - № 4. - С. 30-35.

13. Попова Н.В. Анализ эфирного масла мелиссы лекарственной / Попова Н.В., Литвиненко В.И. // Фармаком. — 2009. - № 1. - С. 37-40.

14. Химический состав эфирного масла мелиссы лекарственной Красноярского края / Степаненко Л.В., Шаталина 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.

15. Куркин В.А. Фармакогнозия — 2-е изд., перераб. и доп. - Самара: ООО «Офорт», 2007. — 1239 с.

16. Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*) / Medina A.S, Etheridge C.J., Hawkes G.E., Hylands P.J., Pendry B.A., Hughes M.J., Corcoran O. // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. — 2007. - Vol. 10, № 4. - P. 455-463.

17. Anti-herpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts. / Dimitrova Z, Manolova N, Pancheva S, Ilieva D, Shishkov S. // Acta Microbiol Bulg. — 1993. - Vol. 29. - P. 65-72.

18. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density / Geuenich S., Goffinet C., Venzke S., Nolkemper S., Baumann I., Plinkert P., Reichling J., Keppler O. T // Retrovirology. — 2008. - № 5. - P. 27.

19. WHO monographs on selected medicinal plants. - Vol. 2. - Geneva, 2002. — 356 p.

20. Попова Н.В. Рослини родини ясноткові як джерела кавової та розмаринової кислот та їх похідних / Попова Н.В., Литвиненко В.И., Певнева О.И. // Фармацевтичний часопис. — 2008. - № 4. - С. 19-23.

21. European Pharmacopoeia. -6th ed.- Strasbourg; Council of Europe, 2007. - P. 4668-4670.

22. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. -11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.

22а. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.

23. Лекарственные растения Государственной фармакопеи / Под ред. Самылиной И.А.. — М.: «АНМИ», 1999. — 496 с.

24. Куркин В.А. Химическое исследование травы *Melissa officinalis* / Куркин В.А., Куркина Т.В., Запесочная Г.Г. // Химия природных соединений. - 1995. - № 2. - С. 318 — 320.

25. Качественный и количественный анализ сырья и настойки мелиссы лекарственной *Melissa officinalis* L. / Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Болтабекова З.В., Вандышев В.В. // Растительные ресурсы. — 1999. - Вып. 3. — Т. 35. - С. 116 — 120.

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

27. Deutsches Arzneibuch 2. - Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2002.

28. British Herbal Pharmacopoeia (BHP). - British Herbal Medicine Association, 1996. - P. 29-30.

Резюме

Попова Н.В., Литвиненко В.И.

Питання стандартизації лікарської рослинної сировини — меліси листя

Проведено аналіз вітчизняної лікарської рослинної сировини — меліси листя на відповідність вимогам монографії Європейської Фармакопеї «Melissa leaf». Показано, що вітчизняні зразки листя меліси відповідають вимогам ЄФ як за макроскопічними, мікроскопічними характеристиками та ідентифікацією методом ТШХ, так і за кількісним вмістом кислоти розмаринової.

Summary

Popova N.V., Litvinenko V.I.

Matters of the standardization of herbal drug – melissa leaf

An analysis of native herbal drug — melissa leaf to the correspondence to requirements of the European Pharmacopoeia monograph “Melissa leaf” was conducted. It was shown that native samples of melissa leaf confirmed to EP requirements as according macroscopic, microscopic indices and TLC identification, and also according assay of rosemary acid.

Попова Наталия Вячеславовна. Окончила Харьковский фармацевтический институт (1981).

К.фарм.н. (1986). Доцент Национального фармацевтического университета (1991).

Литвиненко Василий Иванович (р. 1932). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959).

Д.х.н. (1990). Профессор (1991). Академик Инженерной академии Украины (2000). Зав.сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦАС.

УДК 635.657:577.112.3:577.118

Черкашина А.В., Ковальов С.В.
Національний фармацевтичний університет

Амінокислотний і мінеральний склад трави нуту звичайного

Досліджено амінокислотний і мінеральний склад трави нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.). Встановлено наявність 17 амінокислот, у тому числі 9 незамінних. Домінуючими є глутамінова й аспарагінова кислоти, гліцин, лізин, аланін і лейцин. У результаті вивчення елементного складу відмічено високий вміст калію, кальцію, кремнію, магнію, натрію, фосфору та заліза.

Нут звичайний (*Cicer arietinum* L.) відноситься до роду нут (*Cicer* L.), родини бобових (*Fabaceae*). Рід *Cicer* об'єднує 43 види, із яких у культурі відомий лише один — *Cicer arietinum*. Нут із глибокої давнини застосовується у народній медицині, досить довго культивується на території України і має достатню сировинну базу.

Нут використовується як гіпоглікемічний засіб; відваром із нуту позбавляються від каменів у нирках і сечовому міхурі; компреси з молодих рослин виликають запалення, коросту, покращують колір шкіри, попереджують шкіряні захворювання та знищують бородавки; при застосуванні нуту звичайного значно знижується вміст холестерину та тригліцеридів в умовах експериментальної гіперліпідемії [3, 4, 8].

Аналіз літературних даних свідчить, що наведені фармакологічні ефекти зумовлені вмістом флавоноїдів, фенолкарбонових кислот та інших продуктів вторинного біосинтезу, але на фармакологічну активність впливають і речовини первинного біосинтезу — амінокислоти, білки, макро- та мікроелементи [1-3].

Амінокислоти — джерело подальшого синтезу специфічних тканинних білків, ферментів, пептидних гормонів, деяких вітамінів тощо. Вони мають важливе функціональне значення та широкий спектр фармакологічної дії. Мінеральні речовини беруть участь у здійсненні усіх життєво важливих функцій в організмі людини. Разом із водою вони забезпечують сталість осмотичного тиску, кислотно-основної рівноваги, включаються до різноманітних реакцій обміну речовин. Без макро- та мікроелементів неможливі функції м'язового скорочення, нервової провідності, внутрішньотканинне дихання тощо [2, 6, 9, 10].

Біологічно активні речовини в рослинах знаходяться в легко засвоюваних людським

організмом комплексах і концентраціях. Тому лікарські засоби рослинного походження, що містять комплекс амінокислот, пептидів, мінералів, широко застосовують у медичній практиці, а їх кількість постійно зростає [1, 5, 10].

Метою даної роботи є визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот і аналіз мінерального складу трави нуту звичайного.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували траву нуту звичайного, зібрану в 2007 році (початок липня) на Устимівській дослідній станції рослинництва Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва.

Визначення амінокислотного складу

Попереднє вивчення якісного складу амінокислот у траві нуту звичайного проводили методом висхідної хроматографії на папері «Filtrak FN-4» у системі бутанол — кислота оцтова — вода (БОВ) (4:1:2). Для виявлення амінокислот використовували їх здатність утворювати комплекс синьо-фіолетового кольору при взаємодії із нінгідрином [1, 11].

Для порівняння використовували 0.1 % спиртові розчини амінокислот зі стандартного набору амінокислот (ТУ 6-09-3147-83). Отриману хроматограму висушували на повітрі, обробляли 0.5 % спиртовим розчином нінгідрину та витримували у сушильній шафі при температурі 105 °С протягом (5-10) хв. Амінокислоти ідентифікували із достовірними зразками за забарвленням плям і значенням R_f при паралельному хроматографуванні. Одержані дані наведено в Табл. 1.

Кількісний вміст амінокислот у досліджуваному зразку визначали за допомогою автоматичного аналізатора амінокислот Т 339 («Мікротехна», Прага, ЧРСП). Подрібнений зразок проби (300 мг), попередньо витриманий до постійної

маси, поміщали у пробірку місткістю 50 мл, додавали 10 мл води дистильованої і 10 мл кислоти хлористоводневої, ретельно перемішували та витримували у термостаті при температурі 130 °С протягом 20 год. Після закінчення гідролізу розчин фільтрували, упарювали та доводили рН до 2.2. Для визначення зв'язаних амінокислот аліквоту проби (50 мкл) поміщали в амінокислотний аналізатор.

Для визначення вільних амінокислот до наважки трави нуту (300 мг) двічі додавали по 10 мл спирту (80% об/об), нагрівали до температури 60 °С, центрифугували протягом 10 хв при 1000 об/хв. Спиртовий шар видаляли, а осад переносили у реакційну ємність місткістю 50 мл і піддавали гідролізу та аналізу на аналізаторі (методику зазначено вище).

Кількісний аналіз проводили шляхом порівняння площ піків амінокислот проби зі стандартними зразками амінокислот.

Вміст амінокислоти (С) обчислювали за формулою:

$$\frac{C_1 \times S}{S_1}$$

де:

С — вміст амінокислоти у зразку;

С₁ — вміст амінокислоти у стандартному зразка амінокислоти;

S — площа піка амінокислоти у зразку;

S₁ — площа піка стандартного зразка амінокислоти.

Визначення мінерального складу

Елементний склад трави нуту звичайного аналізували атомно-емісійним спектрографічним методом із фотографічною реєстрацією [5, 7].

Приготування проби для аналізу складалося з обережного обвуглювання рослинної сировини при нагріванні у муфельній пічі із попередньою обробкою проб кислотою сірчаною розведеною.

Аналіз заснований на повному випарюванні проби із кратерів графітових електродів у розряді дуги змінного струму із джерелом збудження спектрів типу ІВS-28 при силі струму 16 А та експозиції 60 с. Для одержання спектрів та їхньої реєстрації на фотопластинках використовували спектрограф ДФС-8 із дифракційними ґратами 600 штр/мм та трилінзовою системою освітлення щілини. Спектри фотографували в області довжини хвиль (250-350) нм.

Для кількісного аналізу використовували градуйовані (стандартні) зразки, специфічні для кожного мікроелемента. Результати аналізу наведено у Табл. 2.

Результати та їх обговорення

У досліджуваній сировині було виявлено 17 амінокислот, у тому числі 9 незамінних: аргі-

Таблиця 1

Якісний склад та кількісний вміст амінокислот у траві нуту звичайного

№	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 ₄ H ₇ O ₄ N	0.16	133	3.8	0.51	2.4	0.32
2.	треонін	C ₄ H ₉ O ₃ N	0.18	119	1.43	0.17	1.5	0.18
3.	серин	C ₃ H ₇ O ₃ N	0.15	105	1.5	0.16	1.8	0.19
4.	глутамінова кислота	C ₅ H ₉ O ₄ N	0.17	147	2.3	0.34	3.45	0.51
5.	пролін	C ₅ H ₉ O ₂ N	0.24	115	-	-	1.5	0.17
6.	цистин	C ₆ H ₁₂ O ₄ N ₂ S	-	240	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості
7.	гліцин	C ₂ H ₅ O ₂ N	0.21	75	1.25	0.1	3.55	0.27
8.	аланін	C ₃ H ₇ O ₂ N	0.20	89	1.6	0.14	2.2	0.2
9.	валін	C ₅ H ₁₁ O ₂ N	0.43	117	0.8	0.09	2.6	0.3
10.	метіонін	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	0.39	149	0.32	0.05	0.38	0.06
11.	ізолейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	0.72	131	0.42	0.06	1.5	0.2
12.	лейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	0.63	131	1.0	0.13	2.6	0.34
13.	тирозин	C ₉ H ₁₁ O ₃ N	0.57	181	0.55	0.1	0.9	0.16
14.	фенілаланін	C ₉ H ₁₁ O ₂ N	0.32	165	0.5	0.08	1.85	0.31
15.	гістидин	C ₆ H ₉ O ₂ N	0.10	155	-	-	0.98	0.15
16.	лізин	C ₆ H ₁₄ O ₂ N	0.05	146	0.5	0.07	4.8	0.7
17.	аргінін	C ₆ H ₁₄ O ₂ N	0.04	174	-	-	3.0	0.52

нін, треонін, валін, метіонін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, гістидин і лізин (Табл. 1). У кількісному відношенні серед незамінних амінокислот переважають лейцин (0.47 мг/г) і лізин (0.77 мг/г). Слід зауважити, що лейцин відіграє важливу роль у процесах скорочення м'язів; входить до складу овальбуміну, міозину, фібрину та інших білків. Серед замінних амінокислот домінують глутамінова (0.85 мг/г) та аспарагінова (0.83 мг/г) кислоти, гліцин (0.37 мг/г) та аланін (0.34 мг/г). Глутамінова й аспарагінова кислоти беруть участь у процесах переамінування амінокислот і знешкодження аміаку, входять до складу альбумінів і глобулінів крові, мають нейромедіаторні функції. Гліцин функціонує як гальмівний медіатор у спинному мозку та у більшості структур стовбура мозку; його призначають для лікування алкоголізму та депресій [1, 2].

Таблиця 2

Результати аналізу мінерального складу трави нуту звичайного

№	Елемент	Вміст елемента, мг/100 г
1.	Fe	40
2.	Si	650
3.	Na	170
4.	Mn	20
5.	Al	80
6.	Pb	0.08
7.	Cr	<0.03
8.	Mg	290
9.	K	2490
10.	Ni	0.08
11.	Ca	660
12.	Mo	0.04
13.	Cu	0.04
14.	P	150
15.	Zn	6
16.	Sr	3

Примітка.

У зразку: Co < 0.03 мг/100 г; Cd < 0.01 мг/100г; As < 0.01 мг/100г; Hg < 0.01 мг/100 г

У результаті вивчення мінерального складу трави нуту звичайного встановлено наявність 16 елементів, із яких 7 – макроелементи, 7 – мікроелементи і 2 – ультрамікроелементи (Табл. 2). Для вмісту знайдених елементів спостерігалася така закономірність: K>Ca>Si >Mg>Na>P>Al>Fe>Mn>Zn>Sr>Ni>Pb>Cu>Mo. Можна відмітити високий вміст калію (2490 мг/100 г), кальцію (660 мг/100г), кремнію (650 мг/100 г), магнію (290 мг/100г), натрію (170 мг/100 г) та фосфору (150 мг/100 г). Саме ці макроелементи відіграють важливу роль в регулюванні водно-електролітного обміну, беруть участь в окиснювально-відновних процесах, у проце-

сах передачі нервово-м'язового збудження, позитивно впливають на імуногенез тощо. Деякі елементи, наприклад, залізо, мідь, магній, цинк, марганець, здатні утворювати комплекси з речовинами органічної природи. Вони входять до складу або активують до 300 ферментів [6, 9, 10].

Серед есенційних або умовно есенційних елементів у досліджуваній сировині було визначено наявність Si, Fe, Mn, Zn, Sr, Ni, Pb, Cu, Mo.

У досліджуваному зразку в межах можливостей виявлення методом емісійної спектроскопії були відсутні кобальт, кадмій, арсен і ртуть.

Висновки

Вперше встановлено якісний склад і кількісний вміст вільних і зв'язаних амінокислот у траві нуту звичайного. У результаті проведених досліджень ідентифіковано 17 амінокислот, 9 із яких є незамінними. У кількісному відношенні переважають глутамінова й аспарагінова кислоти, гліцин, лізин, аланін і лейцин.

Досліджено мінеральний склад і виявлено, що трава нуту звичайного містить 16 макро- та мікроелементів, із яких 9 – есенційні або умовно есенційні. У сировині у значній кількості наявні калій, кальцій, кремній, магній, натрій і фосфор.

ЛІТЕРАТУРА

1. Берестова С.І., Ковальов В.М., Ковальов С.В. Вивчення амінокислотного складу *Humulus lupulus* L. // Фармаком. – 2006. – № 4. – С. 67-70.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
3. Казаков А.Л., Компанцев В.А., Леонтьева Т.П. Флавоноиды *Cicer arietinum* // Химия природных соединений. – 1980. – № 5. – С. 721-722.
4. Кюсов П.А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2001. – 992 с.
5. Кошовий О.М., Комісаренко А.М. Амінокислотний та мінеральний склад екстрактів із листя евкаліпту // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 57-61.
6. Скальній А.В., Рудаков І.А. Биоэлементы в медицине. – М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.
7. Тарасевич Н.И., Семенов К.А., Хлыстова А.Д. Методы спектрального и химико-спектрального анализа. – Москва: МГУ, 1973. – 213 с.
8. Черкашина А.В., Ковальов В.М., Ковальов С.В. Перспективи використання нуту звичайного // Матеріали доповідей Всеукраїнського конгресу «Сьогодення та майбутнє фармації» (16-19 квітня 2008 р., м. Харків) – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 190.
9. Faelten S. Mineral for health. – Emmaus: Rodalc press, 1981. – 534 p.
10. Roman J. Handbook of vitamins, minerals and hormones. – N.Y.: Reinhold, 1981. – 492 p.
11. Wagner H., Blatt S. Plant drug analysis. – Berlin: Springer, 2001. – 384 p.

Резюме

Черкашина А.В., Ковалев С.В.

Аминокислотный и минеральный состав травы нуты обыкновенного

Исследован аминокислотный и минеральный состав травы нуты обыкновенного (*Cicer arietinum* L.). Установлено

наличие 17 аминокислот, в том числе 9 незаменимых. Преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты, глицин, лизин, аланин и лейцин. При изучении элементного состава отмечено высокое содержание калия, кальция, кремния, магния, натрия, фосфора и железа.

Summary

Cherkashina A.V., Kovalev S.V.

Aminoacid and mineral composition of *Cicer arietinum* L. herb

The study of amino acid and mineral composition of *Cicer arietinum* L. herb was conducted. The presence of seventeen amino acids, including nine essential, has been determined.

Glutamic and aspartic acids, glycine, lysine, alanine and leucine were dominating. As a result of the study of elemental composition, the high content of potassium, calcium, silicium, magnesium, sodium, phosphorus and iron was established.

Черкашина Аліна Вікторівна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2007). Аспірант кафедри фармакогнозії НФаУ (2008).

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

УДК 582.948.25:577.115.3

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

Дослідження ліпофільних фракцій трави та підземних органів медуни темної

Визначено якісний і кількісний вміст жирних кислот ліпофільних фракцій (ЛФ) трави та підземних органів медуни темної (*Pulmonaria obscura* Dumort.). Ідентифіковано 10 жирних кислот у траві та 9 у підземних органах. У ЛФ з обох видів сировини у значній кількості містилися такі ненасичені кислоти, як ейкозенова та лінолева, насичені - пальмітинова й ейкозанова. В ЛФ трави також було ідентифіковано арахідонову кислоту.

Види роду медуна (*Pulmonaria* L.) родини шорстколисті (*Boraginaceae* L.) здавна відомі своїми лікувальними властивостями та поширені в Україні. У Харківській області розповсюджена медуна темна (*Pulmonaria obscura* Dumort.), що росте у гаях, широколистяних лісах, дібровах, перелісках, лісостепових районах [4]. Представники цього роду широко використовуються в народній медицині як вітамінні, відхаркувальні та протизапальні засоби [3]. Рослина не офіційна. Трава м. темної виявляє кровоспинну, обволакаючу, відхаркувальну, пом'якшуючу, в'язучу, сечогінну, антисептичну та ранозагоювальну дії [5]. Також медуна темна використовується при анеміях [3]. У підземних органах рослини міститься до 2.9 % дубильних речовин, до 0.37 % фенолкарбонових кислот (літоспермова та кофейна), рутин, а у траві - до 7 % дубильних речовин, антоціани та флавоноїди: ізорафнетин, рутин і кверцетин, марганець, залізо, мідь тощо [6]. За літературними даними було вивчено жирнокислотний склад олії насіння *Pulmonaria officinalis* [7]. Відомостей про вивчення жирних кислот трави та підземних органів м. темної не знайдено.

Метою даної роботи було одержання ліпофільних фракцій (ЛФ) із трави та підземних органів м. темної та вивчення якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот.

В якості об'єктів дослідження використовували підземні органи та траву медуни темної, заготовлені на території Харківської області у

фазу масового цвітіння (травень 2008 року). Для аналізу використовували середні проби серій 14.05.08 (трави - загальною вагою 6.4 кг та підземних органів 2.8 кг). Для отримання ЛФ сировину екстрагували хлороформом в апараті Соксклета із подальшим повним видаленням розчинника [1]. Вивчення якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот у ЛФ проводили методом газорідинної хроматографії. Розділення жирних кислот проводили на хроматографі «Хром-5» на металевій колонці довжиною 2.6 м, заповненій сорбентом «Хроматон-супер» с 10 % полдіетилентглікольсукцинату [2]. Ідентифікацію жирних кислот проводили у порівнянні зі стандартними зразками жирних кислот фірми «Fluka».

Результати досліджень та їх обговорення

Вихід ЛФ, у перерахунку на суху сировину, складав: для трави - 2.20 %, для підземної частини - 1.26 %.

Результати вивчення жирнокислого складу ЛФ наведено в Таблиці. У траві було ідентифіковано 10 жирних кислот, у підземних органах - 9. Загальний вміст жирних кислот був найвищим у підземних органах і складав 25.42 мг/100 мг. У ЛФ обох видів сировини вміст ненасичених жирних кислот був вищим за вміст насичених кислот: а саме - у ЛФ трави у 2 рази, а в ЛФ підземних органів у 1.6 разів. У ЛФ із обох видів сировини з насичених кислот у найбільшій кількості містилися ейкозанова

Таблиця

Кількісний вміст жирних кислот в ліпофільних фракціях підземних органів і трави медуни темної (у перерахунку на абсолютно сухий залишок)

№	Жирна кислота	Вміст жирних кислот у ЛФ мг/100 мг	
		трава	підземні органи
1	лауринова (12:0)	0.06	0.05
2	міристинова (14:0)	0.14	0.11
3	пальмітинова (16:0)	3.54	1.93
4	стеаринова (18:0)	0.44	0.39
5	олеїнова (18: 1)*	1.25	1.05
6	лінолева (18:2)*	4.36	6.60
7	ліноленова (18:3)*	1.53	2.42
8	ейкозанова (20:0)	3.00	7.15
9	арахідонова (20:4)*	0.82	-
10	ейкозенова (20:1)*	6.21	5.72
Вміст суми насичених жирних кислот		7.18	9.63
Вміст суми ненасичених жирних кислот		14.17	15.79
Загальний вміст жирних кислот		21.35	25.42

Примітка.

* — ненасичені жирні кислоти

та пальмітинова кислоти. Так, вміст пальмітинової кислоти у ЛФ трави був майже у 1.2 рази більший ніж вміст ейкозанової кислоти і складав 3.54 мг/100 мг та 3.00 мг/100мг, відповідно, в ЛФ підземних органів, навпаки, ейкозанової кислоти містилося у 3.7 разів більше ніж пальмітинової кислоти. Вміст міристинової та лауринової кислот у ЛФ трави та підземних органів був незначним, однак кількість міристинової кислоти була у 2.2 рази більше ніж лауринової кислоти (Таблиця). Із ненасичених жирних кислот у ЛФ трави найбільше було ейкозенової кислоти — 6.21 мг/100 мг, лінолевої кислоти у півтора рази менше — 4.36 мг/100 мг. У ЛФ підземних органів, навпаки, більше містилося лінолевої кислоти, ейкозенової було у 1.5 рази менше (6.60 мг/100 мг та 5.72 мг/100 мг, відповідно). У ЛФ трави вміст ліноленової кислоти був більшим ніж олеїнової (1.53 мг/100 мг та 1.25 мг/100 мг, відповідно). У підземних органах ліноленової кислоти містилося у 2.3 рази більше ніж олеїнової кислоти та в 1.6 рази більше ніж в ЛФ трави (Таблиця). Тільки в траві м. темної була ідентифікована арахідонова кислота.

Висновки

Із трави та підземних органів м. темної отримано ЛФ та встановлено якісний склад та кількісний вміст жирних кислот.

Було ідентифіковано 10 жирних кислот у траві та 9 кислот — у ЛФ підземних органів. У ЛФ із обох видів сировини у значній кількості містилися такі ненасичені кислоти, як ейкозенова та лінолева, та насичені - пальмітинова та ейкозанова. Також у ЛФ трави була ідентифікована арахідонова кислота.

Одержані результати будуть використані у подальшому вивченні сировини цієї рослини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Методы биохимического исследования / Под. ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
2. Липиды и липофильные компоненты некоторых растений / Кисличенко В.С., Новосел Е.Н., Кузнецова В.Ю., Вельма В.В., Болоховец А.С. // Химия природных соединений. - 2006. - № 2. — С 182-183.
3. Буданцев А.Л. Дикорастущие полезные растения России / А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесновская. — СПб.: Издательство СПХФА, 2001. — 663 с.
4. Горелова Л.Н. Растительный покров Харьковщины: очерк растительности, вопросы охраны, аннотированный список сосудистых растений / Л.Н. Горелова, А.А. Алехин — Харьков. Издательский центр Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, 2002. - 231 с.
5. Полный справочник лекарственных растений — М.: ЭКСМО—Пресс, 2001. — С. 788—789.
6. Кисличенко В.С. Системная фитотерапия: Учеб. пособие для студ. вузов / В.С. Кисличенко, А.В. Зайченко, И.А. Журавель. — Харьков: Изд-во НФАУ: Золотые страницы, 2008. — 256 с.
7. Guil-Guerrero J.L. Gamma-linolenic acid from fourteen boraginaceae species. / J.L. Guil-Guerrero, F. García-Maroto, M.A. Vilches-Ferrón, D. López-Alonso // Industrial Crops and Products. - 2003 — Vol. 18(1). — С. 85-89.

Резюме

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

Исследование липофильных фракций травы и подземных органов медуницы темной

Определён качественный состав и количественное содержание жирных кислот липофильных фракций (ЛФ) травы и подземных органов медуницы темной (*Pulmonaria obscura* Dumort.). Идентифицировано 10 жирных кислот в траве и 9 в подземных органах. В ЛФ из обоих видов сырья в значительном количестве содержались такие ненасыщенные кислоты, как ейкозеновая и линолевая, насыщенные - пальмитиновая и ейкозаноная. В ЛФ травы также была идентифицирована арахидоновая кислота.

Summary

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

Study of lipophilic fractions of the herb and underground parts of *Pulmonaria obscura* Dumort.

Qualitative composition and quantitative content of fatty acids of lipophilic fractions (LF) of the herb and underground parts of *Pulmonaria obscura* Dumort. were determined. 10 fatty acids in the herb and 9 in underground parts were identified. In LF from both kinds of herbal drug in considerable quantities contained such unsaturated acids, as eicosenic and linolic acids. Among saturated fatty acids the main were palmitic and eicosanic acids. Also in LF of herb arachidonic acid was identified.

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.

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

Готові лікарські засоби

УДК 615.453:54.02:615.33:619

Ярних Т.Г., Руденко М.В.

Національний фармацевтичний університет

Обґрунтування складу лікарського препарату для ветеринарної медицини «Антисепт ОксиТ»

Вивчено фізико-хімічні, технологічні властивості субстанції окситетрацикліну гідрохлориду. Проведено дослідження із метою обґрунтування складу твердої лікарської форми у вигляді паличок на піноутворювальній основі для застосування у ветеринарній медицині.

Ендометрит у корів залишається гострою проблемою ветеринарної медицини. За деякими даними у від 15 % до 90 % поголів'я корів тією чи іншою мірою проявляються симптоми цього захворювання, як явні (клінічна форма), так і приховані (субклінічна форма), що, безсумнівно, відбивається на ефективності тваринництва і якості сільськогосподарської продукції [1, 2]. Слід відзначити ще одну грань цієї проблеми - досить трудомістку діагностику прихованих форм ендометриту. Труднощі постановки точного й оперативного діагнозу у польових умовах надають профілактиці післяродових ендометритів у корів особливу роль і роблять її економічно обґрунтованою [3, 4, 5].

Лікування запальних захворювань матки у корів потребує застосування лікарських засобів, що діють на різні ланки патологічного процесу. Основу даної терапії складає внутрішньоматкове введення антибактеріальних препаратів широкого спектру дії [6].

Останнім часом, дуже широке використання у ветеринарній медицині знайшов окситетрацикліну гідрохлорид ((4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(диметиламіно)-3,5,6,10,11,12а-гексагідрокси-6-метил-1,11-діоксо-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагідротетрацен-2-карбоксаміду гідрохлорид) [12]. Розроблена значна кількість препаратів для ветеринарної медицини на основі цієї

субстанції у різних лікарських формах, але у номенклатурі зовсім небагато твердих лікарських форм [6, 7].

Метою даної роботи є вивчення фізико-хімічних і фармако-технологічних властивостей діючої речовини та таблеткових мас для обґрунтування складу твердої внутрішньоматкової лікарської форми (паличок) на піноутворюючій основі для лікування ендометриту у корів.

Враховуючи, що препарат розробляється для утворення піни у порожнині матки, крім стандартних, фармакопейних вимог до твердої лікарської форми, слід враховувати також такі найважливіші показники, як піноутворення у вологому середовищі та стабільність піни, що утворилась. Піноутворення та стабільність піни - важливі показники, що дозволяють доставити діючу речовину безпосередньо у вогнище запалення для надання місцевої дії. Піна утворюється завдяки використанню газотворювальних компонентів (натрію гідрокарбонат і кислота лимонна), та речовин, що стабілізують її. Останні використовують у таблетковому виробництві як пластифікатори. У ході роботи вивчався вплив допоміжних речовин (наповнювачів зв'язувальних речовин, розпушувачів, антифрикційних компонентів) [8] на фармако-технологічні властивості таблеткової маси й показники якості препарату Таблету-

вання одержаних мас проводили на таблетковому пресі (РТМ-4).

Зразки отриманих паличок оцінювались за стійкістю до роздавлювання та розпаданням згідно з вимогами [9, 12].

Вивчення фізико-хімічних і фармако-технологічних властивостей субстанції дозволяє підібрати необхідні допоміжні речовини, а також визначити раціональну технологію препарату [10, 11]. Насипний об'єм і плинність дозволяють прогнозувати можливість одержання твердої лікарської форми (Табл. 1).

Таблиця 1

Фізико-хімічні та фармако-технологічні показники субстанції окситетрацикліну гідрохлориду

Показник	Значення
насипний об'єм, мл	22.6±1.0
об'єм після усадки, мл	15.0±1.0
здатність до усадки, мл	2.0±0.1
насипна густина, г/мл	0.44±0.01
густина після усадки, г/мл	0.66±0.01
плинність, с/100 г	нескінченний час
пресуємість, Н	125.83±1.00
розчинність, час	4 хв 39 с

Фармако-технологічні та фізико-хімічні властивості окситетрацикліну гідрохлориду свідчать про неможливість використання прямого пресування, тобто у технологічному циклі виробництва препарату обов'язкова стадія вологої грануляції. Із урахуванням цього нами були досліджені певні допоміжні речовини, а саме: наповнювачі, розпушувачі, зв'язувальні й антифрикційні речовини, пластифікатори.

В якості наповнювачів досліджували лактозу, магнію карбонат основний, мікрокристалічну целюлозу.

Якість і кількість наповнювача у таблетковій масі може впливати на декілька показників якості твердої лікарської форми, у тому числі на стійкість паличок до роздавлювання [7]. Результати досліджень залежності стійкості до роздавлювання паличок «Антисепт ОксиТ» від вмісту допоміжних речовин зображено на Рис. 1.

Представлена діаграма (Рис. 1) дозволяє простежити помірне зростання стійкості паличок до роздавлювання від підвищення частки зазначених допоміжних компонентів на відрізку (3-9) %. На відрізку вмісту досліджуваних речовин (9-17) % залежність двох зазначених величин змінюється, і стійкість до роздавлювання паличок усе менше залежить від зростання частки даних допоміжних компонентів.

Виходячи із геометрії палички (довжина (55.0±1.0) мм, діаметр (9.0±0.5) мм), максималь-

на стійкість паличок до роздавлювання є вирішальним показником. Зокрема, при високих значеннях цього показника скорочуються втрати при фасуванні паличок до контурних чарункових упаковок. Як оптимальний наповнювач обрана мікрокристалічна целюлоза зі вмістом, близьким до максимального (16.5 %).

У якості зволожувача при вологій грануляції досліджували тільки 96 % спирт тому, що у присутності газоутворювальних компонентів не можна застосовувати водні розчини. Виходячи з того, що зволожувач може вплинути на такий показник якості твердих лікарських форм як розпадання, було проведено вивчено цього впливу. У результаті досліджень з'ясувалося, що використання 96 % спирту в якості зволожувача при вологій грануляції цілком прийнятне й зазначені показники якості залишаються у рамках вимог [12].

В якості розпушувача використовували: суміш натрію гідрокарбонат - кислота лимонна (1.25:1.00) (газоутворювальний компонент); в якості набухаючого агенту досліджували крохмаль картопляний, натрій-карбоксиметилцелюлозу (Na КМЦ), мікрокристалічну целюлозу (МКЦ).

Було досліджено декілька зразків паличок із різним вмістом зазначених речовин. Результати експериментальних даних представлено на Рис. 2.

Представлена діаграма дозволяє простежити значне зниження часу розпадання від підвищення вмісту газоутворювальних компонентів в діапазоні (46-54) %, при подальшому зростанні вмісту такої тенденції не простежується. Що стосується інших допоміжних компонентів (крохмаль картопляний, натрій-карбоксиметилцелюлоза, мікрокристалічна целюлоза), представлених на діаграмі, простежується тенденція вираженої залежності часу розпадання палички від їхнього вмісту. При цьому слід зазначити, що більш виражена залежність простежується при змінах вмісту крохмалю картопляного та мікрокристалічної целюлози.

Таким чином, для створення паличок із окситетрацикліну гідрохлоридом оптимальним є вміст газоутворювальної суміші (1.5 г натрію гідрокарбонату і 1.2 г кислоти лимонної) на рівні 54 % та крохмалю картопляного на рівні 2 %.

В якості антифрикційних речовин досліджували тальк, кальцію стеарат, аеросил, кислоту стеаринову.

При пресуванні краще себе показала суміш тальку та кальцію стеарату у кількості 2 % та 1 %, відповідно.

В якості стабілізатора піни досліджено гліцерин, поліетиленоксид-400, цетилстеариловий спирт, пропиленгліколь.

Для вивчення залежності об'єму утвореної піни від вмісту зазначених речовин, дані компоненти у таблеткову масу вводили у різних кількостях: від 0.5 % до 1.5 % (Рис 3).

Протягом дослідження спостерігалась пряма залежність об'єму утвореної піни від кількості піноутворювачів, але після того як концентрація зазначених речовин перевищувала 1 %, спо-

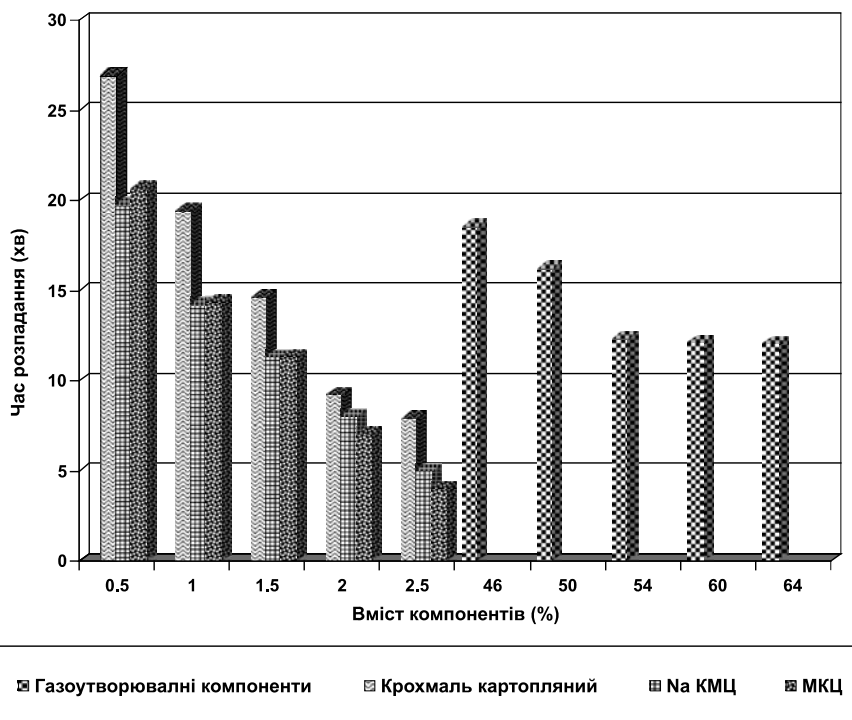
стерігалось налипання паличок до пуансонів, зі збільшенням концентрації це явище посилювалося. Із Рис. 3 видно, що цетилстеариловий спирт виявляє належні піноутворюючі властивості, але при використанні цього компоненту піна мала недостатню стабільність. При цьому решта компонентів при не досить виражених піноутворювальних властивостях утворювали

Рисунок 1



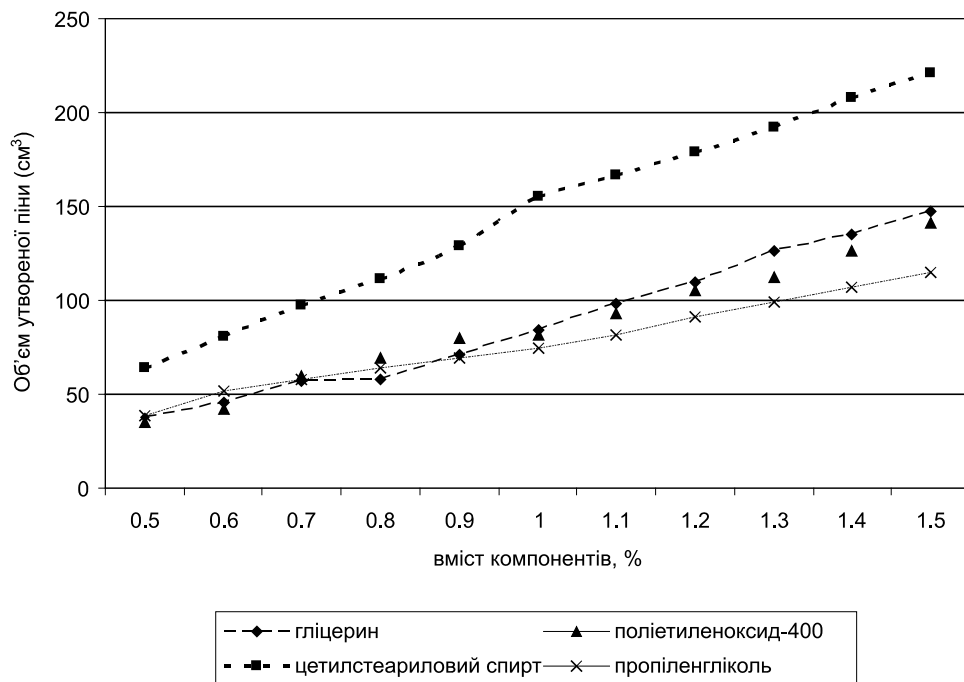
Залежність стійкості до роздавлювання паличок «Антисепт ОксиТ» від природи та вмісту наповнювачів

Рисунок 2



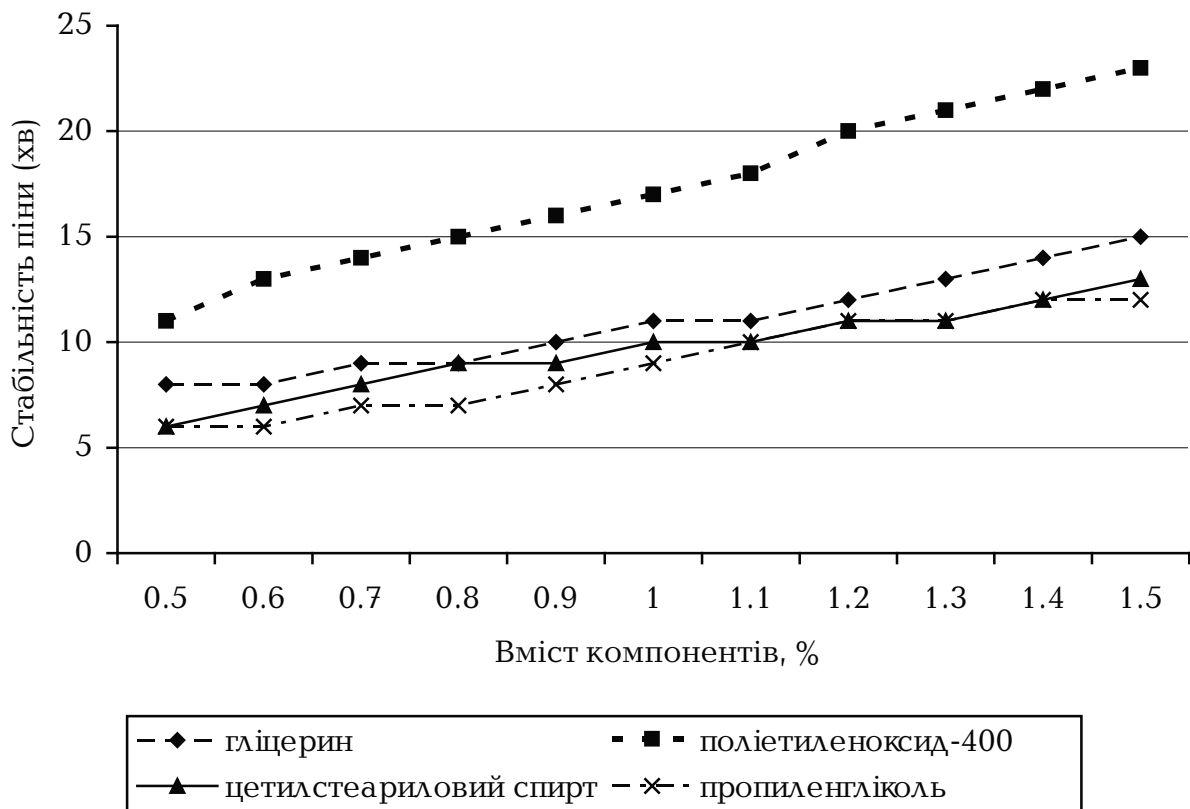
Залежність часу розпадання від природи та вмісту розпушувачів

Рисунок 3



Залежність об'єму утвореної піни від вмісту стабілізаторів піни

Рисунок 4



Залежність стабільності піни від вмісту піноутворювачів

значно стабільнішу піну. Стабільність піни у нашому випадку - дуже важливий показник, що регулює знаходження діючої речовини на запаленій поверхні матки тварини. Тому було також вивчено залежність стабільності піни від концентрації піноутворювачів (Рис. 4).

Представлені дані дозволяють вибрати оптимальну композицію речовин, для досягнення максимального об'єму піноутворення та стабільності піни, що утворилась. Це може бути суміш цетилстеарилового спирту та поліетиленоксиду-400 у кількості по 1 %. При введенні зазначеної композиції речовин було отримано такі результати: об'єм утвореної піни — 215 см³; стабільність утвореної піни — 19 хв. Такі показники сприяють максимальному проникненню піни у різні канали і заглиблення слизової оболонки матки тварин та збільшують площу зіткнення лікарських речовин із поверхнею запалених тканин.

Висновки

Проведено дослідження із обґрунтування складу твердої лікарської форми на піноутворювальній основі із окситетрацикліну гідрохлоридом в якості діючої речовини.

Вивчено фізико-хімічні, фармако-технологічні властивості субстанції та вплив допоміжних речовин на показники якості отриманих паличок: стійкість до роздавлювання, розпадання, об'єм і стабільність утвореної піни.

ЛІТЕРАТУРА

1. LeBlanc S.J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review // *The Veterinary Journal*. — 2008. - Vol. 176 (1). - P. 102-114.
2. Lincke A, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility - a review of recent publications // *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. — 2007. — Vol. 120(5-6). - P. 245-250.
3. Azawi O. I. Postpartum uterine infection in cattle // *Animal Reproduction Science*. — 2008 — Vol. 105 (3-4). - P. 187–208.
4. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle / Földi J., Kulcsár M., Pécsi A., Huyghe B., C. de Sa, Lohuis J., Cox P., Huszenicza G. // *Animal Reproduction Science* - 2006. — Vol. 96 (3-4). - P. 265–281.
5. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle / LeBlanc S.J., Lissemore K.D., Kelton D.F., Duffield T.F., Leslie K.E. // *Journal of Dairy Science*. — 2006. - Vol. 89, № 4. - P. 1267–1279.

6. Руденко М.В., Ярних Т.Г. Вивчення асортименту ветеринарних препаратів для лікування ендометритів у корів // *Фармацевтичний журнал*. — 2008. - № 3. — С. 65-69.

7. Гладух Є.В. Пашнев П.Д. Розробка складу та технології таблеток альтану // *Фармаком*. — 2003. - № 2. - С. 85-90.

8. Чуешов В.И., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. Промышленная технология лекарств: В 2 т. — Харьков: Издательство НФАУ МТК-Книга, 2002. — Т. 2. - 714 с.

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

10. Дитковская А.Г. Разработка состава, технологии и биофармацевтическое исследование таблетированных лекарственных форм триметазина: Автореф. дисс. ... к.фарм.н. — М., 2008. — 25 с.

11. Розробка складу і технології та вивчення гострої токсичності лікарського препарату «Антисепт ФД» для ветеринарії у вигляді паличок на основі фуразалідону та діоксидину / Січкарь А.А., Пашнев П.Д., Ярних Т.Г., Богуцька О.Є., Чуешов В.І., Пашнєва Р.О. // *Вісник фармації*. — 1999. - № 1. — С. 89-92.

12. 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

Ярних Т.Г., Руденко М.В.

Обоснование состава лекарственного препарата для ветеринарной медицины «Антисепт ОкситТ»

Изучены физико-химические, технологические свойства субстанции окситетрациклина гидрохлорида. Проведены исследования с целью обоснования состава твердой лекарственной формы в виде палочек на пенообразующей основе для применения в ветеринарной медицине.

Summary

Yarnykh T.G., Rudenko M.V.

Substantiation of the composition of the drug for veterinary medicine Antisept OxyT

Physicochemical, technological characteristics of the substance of oxytetracyclin hydrochloride were studied. Studies for the purpose of substantiation of the compound of veterinary sticks on foam-forming base were conducted.

Ярних Тетяна Григорівна. Д.фарм.н. Професор. Зав. кафедри технології ліків НФаУ.

Руденко Максим Володимирович. Здобувач кафедри технології ліків НФаУ. Начальник відділу контролю якості Харківської державної біологічної фабрики.

Єрещенко О.А., Стрельников Л.С., Кабачний Г.І., Стрілець О.П.
Національний фармацевтичний університет

Мікробіологічне обґрунтування використання комплексного бактеріофага при розробці пінного препарату в аерозольній упаковці для лікування гнійно-запальних захворювань

Вивчено специфічну активність комплексного бактеріофага під торгівельною назвою «Гіобактеріофаг комплексний» та емульсії, приготованої на його основі. Методом Аппельмана визначено титр бактеріофагів у нативному розчині комплексного бактеріофага та емульсії на основі комплексного бактеріофага по відношенню до специфічних культур. Методом Грація встановлено кількість віріонів в 1 мл комплексного бактеріофага й емульсії. Встановлено пропорційну залежність титру та концентрації бактеріофагів. Мікробіологічним шляхом підтверджено можливість використання комплексного бактеріофага для приготування емульсії при розробці пінного аерозолі.

Вибір раціональної схеми лікування гнійних ран — одна із найбільш гострих і складних проблем хірургії, гінекології, комбустіології. Зміна уявлень про рановий процес, динамічний розвиток хірургії й антимікробної хіміотерапії постійно пред'являють нові вимоги до алгоритму лікування ранових інфекцій [1, 2].

Рановий процес представляє собою складний комплекс реакцій організму у відповідь на ураження тканин, що проявляється у вигляді місцевих деструктивно-запальних змін і загальних реакцій. Відомо, що рановий процес розділяють на три основні фази: гнійно-некротичну, регенерації (утворювання грануляційної тканини) і рубцювання [1, 3]. Забруднення рани мікроорганізмами може відбутися на будь-якому із цих етапів [2, 3]. Мікробний «пейзаж» інфікованих ран і відкритих гнійних процесів різноманітний і варіабільний, що, як правило, змінюється із розвитком місцевої гнійної інфекції [3]. До найбільш поширених збудників гнійно-запальних процесів відносяться як аеробні, так і анаеробні мікроорганізми: золотавий, епідермальний, сапрофітний стафілококи, стрептокок, кишкова паличка, ентеробактерії, протей, клебсієла, синьогнійна паличка тощо [4, 5]. Основною причиною гострих гнійних процесів у м'яких тканинах є патогенний стафілокок, частота виділення якого із ран складає 76.7 %; грамнегативна флора (кишкова паличка, протей, синьогнійна паличка) викликає запалення ран у 13.3 % випадків; в інших випадках (7.9 %) спостерігається виділення стрептококів або асоціації стафілокока із грамнегативною мікрофлорою [1, 3].

Не менш важливою та актуальною проблемою є лікування гнійних опікових ран. У теперішній час співвідношення частоти опіків у розвинутих країнах становить 1 випадок на 1000 населення за рік; летальність при опіках становить від 1.5 % до 5.9 % [6]. При цьому найбільш поширеною причиною летальних випад-

ків після опіків є інфекція, на яку, за даними окремих авторів, припадає 76.3 % летальності постраждалих від опіків. Некротичні тканини, що утворюються у зоні опікового ураження, є сприятливим середовищем для інвазії та розмноження мікроорганізмів, що є причиною розвитку ранової інфекції [6].

На сьогодні лікування гнійних захворювань проводиться за двома напрямками: місцеве застосування антибактеріальних препаратів і системна фармакотерапія. Серед місцевих протимікробних препаратів добре відомі повідон-йод (йодопірон або йодовідон), мазі левосин, левоміколь, діоксиколь, 5 % діоксидинова мазь, препарати сульфадіазину срібла тощо. Для системного застосування використовуються антибіотики майже усіх груп: пеніциліни, цефалоспори, аміноглікози, макроліди тощо [7]. Слід відмітити, що мікрофлора сучасних ран стійка до частого використання антибіотиків, а їх місцеве застосування має ряд недоліків, такі як алергенність, токсичність, біль при нанесенні, низькі рівень penetрації та селективність дії, що, у свою чергу, призводить до порушення нормальної мікрофлори, а також індукції розвитку механізмів резистентності до антибактеріальних препаратів [8, 9].

Найбільш безпечним та ефективним методом місцевого лікування гнійних інфекцій є застосування бактеріофагів, що підтверджує їх використання у клінічній практиці [10]. Завдяки їх високій швидкості дії патогенні мікроорганізми не встигають виробляти механізми резистентності, а висока селективність дії не порушує баланс нормальної мікрофлори [8, 11]. Механізм дії бактеріофагів полягає у лізисі лише патогенних та умовно-патогенних бактерій. Бактеріофаги можуть застосовуватися під час вагітності, лактації у жінок та для немовлят [8]. Але на сучасному фармацевтичному ринку України бактеріофаги існують лише у вигляді рідкої лікарської форми, що має ряд суттєвих

недоліків, а саме: незручність при застосуванні на відкритих ранових поверхнях, розтікання, швидке висихання та інактивація [8]. Розчин бактеріофагів рекомендовано для лікування та профілактики різноманітних форм гнійно-запальних та ентеральних захворювань: захворювань вуха, горла, носу, дихальних шляхів, легенів і плеври, хірургічних, урогенітальних і ентеральних інфекцій, генералізованих септичних захворювань, у тому числі гнійно-септичних захворювань немовлят, що викликані чутливими збудниками [12].

На кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету проводяться наукові дослідження із розробки нової лікарської форми комплексу бактеріофагів у вигляді пінного препарату в аерозольній упаковці. Відомо, що пінні форми препаратів мають ряд переваг: створюють бар'єр для інфікування ран, забезпечують покриття великих площ ранової поверхні із заповнюванням об'ємних ранових каналів та «карманів» при малій кількості препарату за масою, а також виключають «парниковий ефект». Перевагою пінних препаратів також є швидкість обробки ранової поверхні при масовому надходженні постраждалих. Аплікації пін атравматичні, що є важливим фактором у комбустіології [9, 13, 14]. Дана лікарська форма забезпечує високу біодоступність і пролонгацію дії відносно розчину, що обумовлено вмістом високомолекулярних речовин (емульгаторів, піноутворювачів, солюбілізаторів тощо), а також зручна для застосування в акушерстві та гінекології [13, 14].

Метою даної роботи є вивчення специфічної активності комплексного бактеріофага та кількості віріонів в 1 мл гідрозолу й емульсії на основі комплексного бактеріофага в умовах *in vitro* з метою подальшої розробки та стандартизації пінного препарату в аерозольній упаковці з комплексом бактеріофагів.

Об'єкти та методи

Із метою обґрунтування складу пінного препарату у дослідженнях використовували комплексний бактеріофаг «Піобактеріофаг комплексний», виробник – наукове виробниче підприємство «Мікроген», Росія (ФСП 42-0504401304). Гідрозоль бактеріофага являє собою прозору рідину від світло-жовтого до сірувато-жовтого кольору, містить суміш віріонів бактеріофагів, що лізують такі культури мікроорганізми як *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* [15]. Також використовували емульсію, до складу якої входить гідрозоль комплексного бактеріофага, емульгатори першого та другого роду, олія. Емульсія являє собою однорідну рідину білого кольору, що не розширюється при центрифугуванні зі швидкістю 1500 об/хв протягом 5 хв [16].

Специфічну активність і титр гідрозолу бактеріофага та емульсії визначали методом Апфельмана, концентрацію фагових частинок – методом Грація [17, 18].

Метод Апфельмана полягає у приготуванні десятикратних розведень і у визначенні розведення, за якого відбувається лізис досліджуваної тест-культури [17]. За активність брали величину, що відповідала останньому розведенню, в якому ріст культури візуально не спостерігається.

Для визначення концентрації фагових частинок використовували метод Грація, відповідно до якого на дно чашки Петрі наливали (1.5-2) % розчин агар-агару, на який після застигання додавали 0.7 % розчин агар-агару із внесеними в нього 0.2 мл мікробної завіси досліджуваної тест-культури мікроорганізмів та 1 мл комплексного бактеріофага у різних розведеннях (10^{-5} - 10^{-7} , дане розведення дозволило найбільш точно підрахувати кількість «негативних» колоній на чашці Петрі). Випробовувані зразки інкубували

Таблиця 1
Титр досліджуваних об'єктів, визначений методом Апфельмана

Тест-культура	Специфічна активність, визначена методом Апфельмана	
	комплексний бактеріофаг	емульсія з бактеріофагом
<i>Staphylococcus aureus</i>	$10^{-(5.66 \pm 0.3)}$	$10^{-(5.66 \pm 0.8)}$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$10^{-(5.5 \pm 0.2)}$	$10^{-(5.33 \pm 0.5)}$
<i>Proteus vulgaris</i>	$10^{-(5.17 \pm 0.2)}$	$10^{-(5.1 \pm 0.4)}$
<i>Escherichia coli</i>	$10^{-(5.17 \pm 0.1)}$	$10^{-(5.33 \pm 0.2)}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$10^{-(5.1 \pm 0.2)}$	$10^{-(4.83 \pm 0.4)}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$10^{-(4.17 \pm 0.2)}$	$10^{-(4.33 \pm 0.5)}$

Примітки:

n = 6;

P = 95;

M ± m — довірчий інтервал

у термостаті ТС-80 при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Облік результатів проводили через (18-20) год, шляхом підрахування кількості «негативних» колоній і помноження цієї величини на ступінь розведення комплексного бактеріофага, виходячи з того, що один віріон бактеріофага утворює одну «негативну» колонію [17].

В якості тест-культур використовували штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* TK 11B.

Результати та їх обговорення

Технологія виробництва пінних аерозолів передбачає попереднє створення стабільної емульсійної системи та перевірку її якісних і кількісних характеристик. Для подальшого вивчення у лабораторних умовах був приготовлений зразок емульсії на основі комплексного бактеріофага.

Специфічну активність гідрозолу комплексного бактеріофага та отриманого зразка емульсії перевіряли методом Апфельмана (Табл. 1).

У результаті мікробіологічного дослідження встановлено, що комплексний бактеріофаг та емульсія виявляють лізуючу здатність у великих розведеннях, що свідчить про високий титр бактеріофагів. Найвища здатність комплексного бактеріофага викликати лізис виявлена щодо штамів *S. aureus*, при цьому активність складає $10^{-(5.66 \pm 0.3)}$, найнижча $10^{-(4.17 \pm 0.2)}$ — щодо штамів *K. pneumoniae*. Із даних, наведених у Табл. 1, також можна зробити висновок, що здатність бактеріофага викликати лізис специфічних тест-культур не втрачається після введення його до складу емульсійної системи. Визначено, що, як і у гідрозолі, в емульсії з комплексним бактеріофагом спостерігається найвища здатність до лізису штамів *S. aureus* $10^{-(5.66 \pm 0.8)}$, а найнижча — до лізису штамів *K. pneumoniae* $10^{-(4.33 \pm 0.5)}$.

Таким чином, досліджена емульсія мала високий титр, визначений методом Апфельмана, та не поступалася розчину бактеріофага, що свідчило про велику концентрацію віріонів бактеріофага в об'ємі готової емульсії.

Кількість віріонів у розчині бактеріофага та емульсії з бактеріофагом вивчали методом Грація. Результати вивчення наведено в Табл. 2.

Титр, визначений методом Грація, для віріонів бактеріофага, що викликають лізис *S. aureus*, виявився найвищим і склав 180.33 ± 16.04 «негативних» колоній у розведенні 10^7 , а титр для *K. pneumoniae*, навпаки, найнижчим — 40.67 ± 17.74 «негативних» колоній у розведенні 10^5 . Дані, отримані для емульсії, вказують на те, що в 1 мл емульсії з бактеріофагом міститься не менше віріонів, ніж у нативному розчині бактеріофага. Найвища кількість «негативних» колоній для штамів *S. aureus* — 149.0 ± 25.2 у розведенні 10^7 , а найнижча для штамів *K. pneumoniae* — 67.83 ± 21.04 у розведенні 10^5 .

Із отриманих експериментальних даних можна зробити висновок, що чим вищий титр гідрозолу бактеріофага та емульсії, вимірний методом Апфельмана, тим більша виявилась кількість віріонів в 1 мл гідрозолу бактеріофага та емульсії, визначена методом Грація. Для усіх видів бактеріофагів спостерігалась пропорційна залежність титру, визначена методом Апфельмана від кількості частинок віріонів, визначених методом Грація.

Отримані дані будуть використані у подальшій розробці складу та технології нового пінного препарату в аерозольній упаковці на основі комплексного бактеріофага та його стандартизації.

Висновки

Вивчено специфічну активність комплексного бактеріофага методом Апфельмана та встановлено, що найвища здатність викликати

Таблиця 2

Концентрація вірусних частинок бактеріофага досліджуваних об'єктів, визначена методом Грація

Тест-культура	Концентрація вірусних частинок бактеріофага (од/г)	
	комплексний бактеріофаг	емульсія з бактеріофагом
<i>Staphylococcus aureus</i>	$(180.33 \pm 16.04) \times 10^7$	$(149.0 \pm 25.2) \times 10^7$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$(98.17 \pm 10.62) \times 10^6$	$(87.5 \pm 41.14) \times 10^6$
<i>Proteus vulgaris</i>	$(60.17 \pm 12.93) \times 10^5$	$(46.5 \pm 12.59) \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	$(123.83 \pm 15.42) \times 10^6$	$(140.5 \pm 21.32) \times 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$(66.0 \pm 9.53) \times 10^6$	$(57.0 \pm 15.62) \times 10^6$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$(40.67 \pm 17.74) \times 10^5$	$(67.83 \pm 21.04) \times 10^5$

Примітки:

$n = 6$;

$P = 95$;

$M \pm m$ — довірчий інтервал.

лізис виявлена відносно штамів *S. Aureus*, при цьому активність складає $10^{-(5.66 \pm 0.3)}$, найнижча — $10^{-(4.17 \pm 0.2)}$ для штамів *K. pneumoniae*.

Визначення кількості віріонів в 1 мл бактеріофага методом Грація, показало, що найвищу кількість віріонів виявлено для штамів культури *S. aureus* $(180.33 \pm 16.04) \times 10^7$, найнижчу - для штамів *K. pneumoniae* — $(40.67 \pm 17.74) \times 10^5$.

Встановлено, що введення комплексного бактеріофага до складу емульсії не знижує його якісні та кількісні характеристики порівняно з гідрозолем бактеріофага, що підтверджено випробуваннями методами Аппельмана та Грація.

На основі мікробіологічних досліджень підтверджено можливість застосування емульсії, що містить комплексний бактеріофаг, олію, емульгатори першого та другого роду, при розробці пінного препарату.

Використані методи досліджень дозволили підтвердити пропорційну залежність між вмістом віріонів бактеріофага в 1 мл комплексного бактеріофага та його активністю. Результати досліджень будуть використані для якісної та кількісної характеристики нової лікарської форми з комплексним бактеріофагом при розробці проекту АНД.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сучасне медикаментозне лікування ран: Відом. інстр. / Шалімов О.О., Сасенко В.Ф., Даценко Б.М., Ляпунов М.О., Безугла О.П. та ін. — К.: Ін-т хірургії та трансплантології АМН України, 2002. — 35 с.
2. Гайдуль К.В. Раневая инфекция: этиология, диагностика и антимикробная терапия / К.В. Гайдуль, А.А. Муконин. - Из-во АБОЛмед, 2005. — 31 с.
3. Даценко Б.М. Гнойная рана / Даценко Б.М., Белов С.Г., Тамм Т.И. — К.: Здоров'я, 1985. — 136 с.
4. Абрамченко В.В. Гнойно-септическая инфекция в акушерстве и гинекологии / В.В. Абрамченко, Д.Ф. Костюченко, Э.Д. Хаджиева. — СПб.: СпецЛит, 2005. — 459 с.
5. Анаэробная инфекция в акушерско-гинекологической практике / Цвелев Ю.В., Кочеровец В.И., Кира Е.Ф., Баскаков В.П. — СПб.: Питер Пресс, 1995. — 320 с.
6. Юденич В.В. Лечение ожогов и их последствий / Юденич В.В. — М.: Медицина, 1980. — 191 с.
7. Гуртовой Б.Л. Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии / Гуртовой Б.Л., Кулаков В.И., Воропаева С.Д. — М.: Триада-Х, 2004. — 176 с.
8. Функнер Е.В. Микробиологические и технологические аспекты разработки комплексного препарата бактеріофагов: Автореф. дис. ... к.мед.н. — Пермь, 2007. — 23 с.
9. Аспекты применения препаратов бактеріофагов в лечении гнойных ран / О.А. Ерещенко, Л.С. Стрельников, Г.И. Кабачный, О.П. Стрилец // Материалы науч.-практ. конф.: Биотехнология. Биомедицинская инженерия и технология современных социальных практик, 3-5 апр. 2009 г. - Курск, 2009. — С. 40.
10. Результаты изучения клинической эффективности новых препаратов бактеріофагов при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных условно-патогенными бактериями /Н.Н. Ворошилова, Г.Г. Боговазова, Т.Б. Казакова и др. // Материалы науч.-практ. конф.: Диагностика, профилактика и лечение гнойно-септических

заболеваний лекарственными средствами, выпускаемыми НПО «Иммунопрепарат». — Уфа, 1993, — С. 26-31.

11. Кюттер Э. Фаговая терапия: бактеріофаги как антибиотик / Э. Кюттер. — СПб.: Науч. исслед. инст.-т детск. инф., 2001. — 41 с.
12. Лазарева Е.Б. Бактеріофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний / Е.Б. Лазарева // Антибиотики и химиотерапия. — 2003. — Т. 48, № 1. — С. 36-40.
13. Фармацевтические аэрозоли / Башура Г.С., Неугодов П.П., Хаджай Я.И., Теллерман Л.С. — М.: «Медицина», 1978. — 272 с.
14. Промислова технологія ліків: В. 2 т. / Чуєшов В.І., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. та ін. / За ред. проф. В.І. Чуєшова: [Підручник] — Х.: Основа; Видавництво УкрФА, 1999. - Т. 2. — 704 с.
15. Ерещенко О.А. Розробка складу та технології пінного препарату бактеріофагу. Повідомлення 1. Вплив емульгаторів першого та другого роду і їх концентрацій на стабільність та специфічну активність емульсії олія/вода з гідрозолем бактеріофагу стафілококового / О.А. Ерещенко, Л.С. Стрельников, Г.І. Кабачный // Запорожский медицинский журнал. — 2008. — №5. — С. 116-120
16. Тихонов А. И. Технология лекарств / А. И. Тихонов, Т.Г. Ярных. [Учебник] — Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2002. — 704 с.
17. Кондратьев К.Н. Бактеріофаг (конспект лекцій). — Чебоксары, 1977. — 49 с.
18. Адамс М. Бактеріофаги. — М.: Из-во иностр.лит., 1961. — 397 с.

Резюме

Ерещенко О.А., Стрельников Л.С., Кабачный Г.И., Стрилец О.П.

Микробиологическое обоснование использования комплексного бактеріофага при разработке пінного препарата в аэрозольной упаковке для лечения гнойно-воспалительных заболеваний

Изучена специфическая активность комплексного бактеріофага под торговым названием «Пиобактеріофаг комплексный» и емульсии, приготовленной на его основе. Методом Аппельмана определили титр бактеріофагов в нативном растворе комплексного бактеріофага и образце емульсии на основе комплексного бактеріофага по отношению к специфическим культурам. Методом Грация установили количество вирионов в 1 мл комплексного бактеріофага и емульсии. Установлена пропорциональная зависимость титра и концентрации бактеріофагов. Микробиологическим путем подтверждена возможность использования комплексного бактеріофага для приготовления емульсии при разработке пінного аэрозоля.

Summary

Ereschenko O.A., Strelnikov L.S., Kabachniy G.I., Strilec O.P.

Microbiological basis of the use of complex bacteriophage at the development of foam drug in the form of aerosol for the treatment of pyoinflammatory diseases

Specific activity of complex bacteriophage at the development of foam drug with the trade name "Piobakteriophage complex" and an emulsion on its base was studied. With the use of Appeliman's method the titer of bacteriophages in native solution of complex bacteriophage and emulsion simple relative to specific cultures were established, by Grace's method the quantity of virions in 1 ml of complex bacteriophage and emulsion was determined. Proportional dependence of the titer and concentration of bacteriophage was determined. With the use of microbiology the ability of the use of complex bacteriophage for the preparing of emulsion system at the development of foam aerosol was confirmed.

Ерещенко Оксана Антонівна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2006). Аспірант кафедри біотехнології НФаУ з відривом від виробництва (2007).

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

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

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

Екстемпоральні лікарські засоби

УДК 615.07:54.062:543.422

Євтіфєєва О.А., Георгіянц В.А., Савченко Л.П.
Національний фармацевтичний університет

Вивчення однорідності маси простих порошоків, виготовлених в умовах аптеки, на відповідність вимогам Державної Фармакопеї України

Вперше в умовах аптек різних областей України проведено визначення метрологічних характеристик одного із технологічних процесів виготовлення екстемпоральних простих порошоків — дозування — відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ). Випробування на однорідність маси дозованих одиниць було проведено за умовами статей ДФУ 2.9.5. та 2.9.40. Отримані об'єднанні метрологічні характеристики процесу дозування як за масою ($RSD_{об'єд.} = 1.71\%$), так й за об'ємом ($RSD_{об'єд.} = 3.53\%$), свідчать, що якість виготовлення простих порошоків в умовах аптек відповідає вимогам ДФУ.

Сучасна концепція (система) забезпечення якості лікарських препаратів являє собою систему належних практик на всіх етапах життєвого циклу лікарських препаратів. Практично у всіх країнах є виготовлення лікарських засобів в умовах аптек, що мають відповідати вимогам національних фармакопей або іншим державним нормативним документам, і бути придатними до використання, згідно із призначенням лікаря [1-3].

Виробництво лікарських засобів в аптеках в Європейському Союзі (ЄС) здійснюється згідно зі стандартами, розробленими (у рамках роботи Конвенції з фармацевтичних інспекцій (PIC)) відповідно до програми співробітництва щодо фармацевтичних інспекцій (PIC/S) і наведені в документі «Провідні принципи PIC/S із належної практики до процесів виготовлення лікарських препаратів у закладах охорони здоров'я» [4].

Щодо виготовлення лікарських засобів в умовах аптек Фармакопея США містить декілька загальних статей 1075 «Good compounding practices» (Належна практика виготовлення екстемпоральних лікарських засобів), 795 «Pharmaceutical compounding — nonsterile preparations» (Виготовлення екстемпоральних нестерильних лікарських засобів), 797 «Pharmaceutical compounding — sterile preparatic» (Виготовлення екстемпоральних стерильних лікарських засобів), 41 «Weights and balances» (Важки та

ваги), 1176 «Prescription balances and volumetric apparatus» (Аптечні ваги та мірний посуд) [5].

В Україні виготовлення лікарських препаратів в умовах аптек регламентується Державною Фармакопеею України (ДФУ) [6-8], наказами МОЗ [9, 10], методичними рекомендаціями [11, 12] та інструкціями. Згідно вимог ДФУ розрізняють екстемпоральні лікарські засоби (ЕЛЗ), виготовлені за рецептом лікаря для конкретного пацієнта або за замовленням лікувально-профілактичного закладу, та лікарські засоби, виготовлені про запас. Перші готують «під наглядом» та зазвичай вони не підлягають фізичному та хімічному контролю, тобто для цієї категорії ЕЛЗ загальні принципи аптечної технології виготовлення лікарських засобів мають забезпечувати відповідність ЕЛЗ вимогам відповідних загальних статей ДФУ на лікарські форми. Інша категорія - ЕЛЗ, що виготовляються заздалегідь за попередньо розробленими та затвердженими у визначеному порядку технологічними інструкціями, де має бути визначена технологія, зазначене обладнання, норми та нормативи виготовлення лікарського засобу в умовах аптеки, методи контролю, його якісні та кількісні показники, їх допустимі межі, вимоги до упаковки, маркування, умови зберігання, термін придатності. Тобто, для обох категорій ЕЛЗ важливо оцінити усі технологічні операції при виготовленні ЕЛЗ на відповідність вимогам ДФУ [8].

Метою даної роботи було вивчення метрологічних характеристик одного із технологічних процесів виготовлення простих дозованих порошків — дозування — в умовах аптек різних областей України.

1. Теоретична частина

1.1. Нормативне регулювання виготовлення, контролю якості та відпуску екстемпоральних порошків

Порошки, виготовлені в умовах аптек, мають відповідати вимогам ДФУ [6-8] (статті «Екстемпоральні лікарські засоби» (5.N.1.); національній частині «Приготування порошків» ex tempore») загальної статті на лікарські форми «Порошки для орального застосування»; за своїми технологічними властивостями мають витримувати вимоги статті «Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу» (2.9.5.), або «Однорідність дозованих одиниць» (2.9.40.)), бути виготовленими із дотриманням норм технологічного процесу згідно до методичних рекомендацій «Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек» [11], а також пройти усі види внутрішньоаптечного контролю відповідно до наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження правил виготовлення лікарських засобів в умовах аптек» [9].

1.2. Характеристика лікарської форми

Порошки для орального застосування являють собою лікарську форму, що складається із твердих окремих сухих частинок різного ступеня здрібненості. Прості порошки складаються з однієї речовини. Більшість простих порошків відпускається з аптеки у дозованому вигляді, оскільки вони призначені для внутрішнього застосування. Дозовані прості порошки (Pulveres divisi) — це порошки, поділені на дози.

1.3. Технологічні аспекти виготовлення простих дозованих порошків в умовах аптек

Технологія виготовлення екстемпоральних простих дозованих порошків включає стадії подрібнення та дозування [13].

У нездрібненому вигляді відпускаються прості порошки, що перед застосуванням розчиняють у воді або які за своєю природою є достатньо дисперсними. В іншому разі прості порошки обов'язково подрібнюють. Здрібнення має велике значення для точного дозування. При здрібненні розмір частинок лікарської речовини зрівнюється, після чого вони не розшаровуються при дозуванні. При виготовленні порошків в умовах аптеки лікарські речовини

прямо у ступці доводять до максимально можливого ступеня здрібненості, що визначається візуально. За відсутністю спеціальних вказівок, лікарські речовини подрібнюють до розміру частинок не більше 0.160 мм [13]. В умовах аптек здрібнення проводять за допомогою ступки. Кожна ступка, у залежності від діаметру (мм), має певну робочу поверхню (см²), певний коефіцієнт втрат по відношенню до ступки № 1, робочий об'єм (см³), час подрібнення (с), максимальне завантаження (г), а також оптимальне завантаження (г) [11]. У методичних рекомендаціях [11] наведено дані щодо втрати твердих лікарських засобів при розтиранні їх у ступці № 1 (мг), що дозволяє враховувати втрати лікарських речовин при виготовленні екстемпоральних порошків. У разі простих порошків на однорідність порошкової суміші вплив будуть справляти тільки фізико-хімічні властивості діючої речовини.

Процес дозування — основна операція при виготовленні простих дозованих порошків. Процес дозування полягає у розподіленні порошкової маси на окремі дози. Основна мета дозування — досягнення точної маси кожної окремої дози.

Від точності виконання зазначеної операції залежить якість виготовлення лікарського засобу. Дозування проводиться за допомогою спеціальних пристроїв, до яких висуваються відповідні вимоги, при цьому користуються метрологічною системою мір, яка є загальноприйнятою й обов'язковою [3, 11, 13].

Точність дозування, у свою чергу, залежить від правильності та чутливості вагів, правильності зважування, ступеня здрібнення лікарських засобів, однорідності порошкової маси.

1.4. Характеристики матеріалу, що дозується

Державна Фармакопея України [6, 8] для матеріалу, що дозується, регламентує такі характеристики, як насипний об'єм, насипна густина, питома площа поверхні та плинність.

Насипний об'єм — об'єм одиниці маси повільно насипаного матеріалу см³/г.

Насипна густина (до або після усадки) пов'язує обратною залежністю масу та об'єм, що вона займає, обчислюється за формулою:

$$\rho_n = \frac{m}{V_0} \left(\frac{\text{г}}{\text{см}^3} \right); \rho_n^{\max} = \frac{m}{V_{1250}} \left(\frac{\text{г}}{\text{см}^3} \right) \quad [8].$$

Про розпилуваність лікарських речовин судять не за величиною їх густини, а за їх насипним об'ємом. Насипний об'єм характеризує ступінь розпиленості лікарських речовин. Чим

більше насипний об'єм речовини, тим більше вона схильна до розпилювання.

Між насипним об'ємом та об'ємною масою існує зворотно пропорційна залежність, тому що більшість лікарських засобів із великим насипним об'ємом (магнію оксид — $2.584 \text{ см}^3/\text{г}$) мають незначну об'ємну масу (магнію оксид — $0.387 \text{ г}/\text{см}^3$) і навпаки, лікарські засоби із незначним насипним об'ємом (вісмуту субнітрат — $0.576 \text{ см}^3/\text{г}$) мають велику об'ємну масу (вісмуту субнітрат — $1.735 \text{ г}/\text{см}^3$) [11]. Величини об'ємних мас ($\text{г}/\text{см}^3$), густини ($\text{г}/\text{см}^3$) для деяких лікарських речовин наведено в методичних рекомендаціях [11].

Плинність порошкової маси є комплексним параметром, що характеризує здатність матеріалу текти у вертикальному напрямку під силою своєї ваги. На плинність не усадженої порошкової маси впливають численні фактори, що характеризують плинний матеріал: розмір, форма, насипна густина частинок, коефіцієнти тертя між частинками та зовнішнього тертя, вологість. Наведені фактори пов'язані між собою. Наприклад, при збільшенні розміру частинок плинність зростає, однак за однакового складу вона може бути не однаковою через різну питому площу поверхні. Тобто, при механічному здрібненні одночасно відбувається два процеси: роз'єднання частинок під дією докладеної сили та укрупнення дрібних частинок під дією взаємного притягання [13].

Зменшення насипної густини знижує плинність, однак при рівній насипній густині порошкова маса буде мати різну плинність, бо вона залежить від форми частинок та коефіцієнта тертя між частинками. Вміст вологи у порошкової масі справляє значний вплив на плинність та сприяє спресуванню порошкової маси. Підвищення вологості порошкової маси знижує її плинність через утворення адсорбційного шару на частинках та підвищує адгезивні властивості як одна до одної, так і до стичних із ними поверхней. При недостатній вологості матеріалу знижується сила зчеплення між частинками порошкової маси.

Якість дозування у значній мірі залежить від технологічних властивостей порошкової маси, тобто фізико-хімічні властивості лікарських речовин по-різному впливають на прецизійність дозування маси та точність дозування лікарського препарату.

Враховуючи вищезазначене, можна зробити висновок, що фізико-хімічні властивості лікарських речовин можуть активно впливати на якість дозування порошкової маси, а також що при дозуванні необхідно оцінити цей вплив для конкретного складу лікарської форми.

1.5. Метрологічні характеристики аптечних дозаторів

Фасування порошоків в аптеках і зараз є найбільш трудомісткою й малопродуктивною операцією. Складність механізації даної операції пояснюється значною номенклатурою та невеликими партіями порошоків, а також специфічними вимогами, яким мають відповідати дозуючі пристрої.

1.5.1. Дозування за масою

Одним із найпоширеніших способів дозування в аптеці є зважування, що виконується за допомогою вагів. Вони являють собою прилад, призначений для визначення вагової маси даних лікарських засобів за способом порівняння її з еталонами мас (з умовно прийнятими одиницями — важками).

Із точки зору метрологічних характеристик (стійкість, постійність показників, чутливість, точність або правильність) розрізняють ваги: метрологічні, аналітичні, технічні 1, 2, 3 класів тощо.

Для приготування лікарських препаратів в умовах аптечної практики використовують рівноплечі технічні (рецептурні) і аптекарські ручні ваги (терези). Як одні, так і інші належать до категорії технічних вагів 2-го класу. У матеріальній кімнаті застосовують звичайні настільні шалькові ваги, а для зважування значних мас — десяткові й сотенні ваги [11, 13].

Дозування порошоків за масою проводиться за допомогою ручних аптечних вагів (ВР).

Ваги ручні аптечні марки ВР (ГОСТ 7328-61) призначені для дозування за масою сухих речовин у кількості від 0.02 г до 100 г, а також для проведення технічних аналізів. Залежно від допустимого граничного навантаження, ваги ручні аптечні бувають декількох типорозмірів: ВР-1, ВР-5, ВР-20, ВР-100.

Наприклад, ручні аптечні ваги (ВР-5) характеризуються такими метрологічними характеристиками як стійкість, постійність показників, правильність та чутливість (межа зважування: найбільша — 5.0 г, найменша — 0.1 г). Припустима похибка вагів дорівнює: ненаважених $\pm 2 \text{ мг}$ (0.002 г), для 1/10 найбільшої припустимої наважки (0.5 г) $\pm 4 \text{ мг}$ (0.004 г), для найбільшої наважки $\pm 10 \text{ мг}$ (0.01 г).

Ваги, незалежно від їх конструкції, за метрологічними властивостями мають відповідати вимогам ГОСТ для даного типу вагів. Якщо величина метрологічних характеристик більша допустимої, ваги вважають нечутливими. Їх вилучають із користування і направляють на перевірку [11, 13].

1.5.2. Дозування за об'ємом

Крім дозування за масою застосовується дозування порошкової маси за об'ємом. Об'ємна ложка-дозатор проста за будовою, нескладна в експлуатації та при відносній похибці (2-3) % забезпечує належну продуктивність - від 6 доз до 15 доз порошоків за хв. Прикладом дозатора за об'ємом може бути ложка-дозатор ТК-3 і дозатори ДПР-1 та ДПР-2 [13]. Ці дозатори розраховано на дозування порошоків від 0.2 г до 1.0 г. Прилад ТК-3 нагадує за формою ложку, складається із корпусу, скидача, дозатора й гвинта настройки. Перед початком роботи встановлюють задану масу дози. Для цього бункер дозатора поміщають у порошкову масу. Роблячи упор пальцем правої руки, пересувають скидач у бік бункера і видаляють надлишок порошку, тримаючи прилад над посудиною із порошковою масою. Не знімаючи пальця, скидач повертають у вихідне положення, відкриваючи тим самим бункер. Дозу висипають на ваги і перевіряють масу. Тобто перевірку точності дозування проводять на ручних аптечних вагах. У цьому разі теоретична похибка дозування буде дорівнювати сумі двох похибок: ложки-дозатора та вагів (ВР). Якщо маса дози перевищує припустиме відхилення, регламентоване технічним паспортом ($\pm 2-3\%$), обертанням гвинта настройки регулюють необхідний об'єм бункера та знову перевіряють масу за допомогою вагів. Після цього прилад готовий до роботи. Після використання його слід добре почистити, при необхідності - розібрати [13].

Дозатори ДПР-1 та ДПР-2 виконані у вигляді порожнистого циліндричного корпусу із рухливо змонтованим всередині штоком, ходовою гайкою і знімним наконечником. Принцип роботи полягає у заповненні регульованої мірної порожнини фасованим порошком при зануренні наконечника дозатора у цей порошок. Перевірку маси проводять також за допомогою вагів (ВР). Дозування порошку здійснюється шляхом переміщення штока.

Рекомендована вага дозованих порошоків в аптеці не менше 0.2 г і не більше 1.0 г (що пов'язано зі зручністю приймання). Оптимальна вага екстемпоральних дозованих порошоків становить (0.3-0.5) г [11].

1.6. Показники якості екстемпоральних порошоків

Технологічні операції мають забезпечувати належний рівень якості лікарського препарату. Відповідно до вимог ДФУ [8], прості дозовані порошки звичайно контролюють за такими показниками якості: опис, ідентифікація, однорід-

ність дозованих одиниць або однорідність маси/однорідність вмісту, кількісне визначення. У Табл. 1 наведено вимоги нормативної документації при контролі якості простих дозованих порошоків «ex tempore» на однорідність дозованих одиниць. Критерії відповідності на однорідність маси для одиниці дозованого порошку за наказом МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження правил виготовлення лікарських засобів в умовах аптек» [9] співпадають із вимогами статті ГФ ХІ [14] і є більш суворими, ніж вимоги статей ДФУ 2.9.5. [6] та 2.9.40. [8]. Оскільки якість простих дозованих порошоків для усіх лікарських засобів, незалежно від виготовлення (екстемпоральне або промислове), нормується статтями ДФУ 2.9.5. та 2.9.40, тобто випробуванням на однорідність маси дозованих одиниць, визначення якості виготовлених у процесі експерименту порошоків було проведено за цими статтями ДФУ.

1.7. Вибір об'єкта дослідження

Для проведення досліджень обрано простий дозований порошок кислоти аскорбінової по 0.5 г № 100 (аптечна заготівка). Кислота аскорбінова являє собою дрібнокристалічний порошок або безбарвні кристали. Виходячи із правил аптечної технології та враховуючи природу речовини, при виготовленні лікарської форми аскорбінову кислоту попередньо подрібнюють. Отримана порошкова маса має середні властивості плинності, насипний об'єм дорівнює $1.15 \text{ см}^3/\text{г}$ (у порівнянні з еталонною речовиною — водою — $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ см}^3/\text{г}$), тобто має невелику схильність до розпилювання. Вибір дози (0.5 г) також не випадковий: для ручних аптечних вагів 0.5 г — 1/10 максимально припустимої наважки (межі зважування від 0.1 г до 5.0 г), для ложки-дозатора ця наважка теж є середньою величиною (межі зважування від 0.2 г до 1.0 г), що дозволяє провести її фасування в умовах аптек як ручними аптечними вагами, так і ложкою-дозатором. До того ж ця лікарська форма відноситься до найбільш розповсюджених простих дозованих порошоків.

1.7 Втрати при виготовленні

Оскільки при виготовленні порошоків є втрати порошкової маси, було доцільно їх теоретично прорахувати. Припустимі втрати при зважуванні ($0.5 \times 100 = 50.0 \text{ г}$) на ВР-100 розраховували, враховуючи за ГОСТ похибку, припустиму при зважуванні 50.0 г. Так як наважка найближча за значенням до максимального навантаження, то допустима похибка буде 0.05 г (50 мг) — абсолютна чутливість. Відповідна відносна похибка зважування становить $\pm 0.1\%$ ($0.05/50 \times 100 = 0.1\%$).

Таблиця 1

Вимоги нормативної документації при контролі простих порошків „ex tempore» на однорідність одиниць або однорідність маси/однорідність вмісту

	Критерії відповідності на однорідність дозованих одиниць за вимогами статті ДФУ 2.9.40.	Критерії відповідності на однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.5.	Критерії відповідності при контролі якості порошків «ex tempore» за вимогами загальної статті ДФУ «Порошки для орального застосування»	Критерії відповідності на однорідність маси для одиниці дозованих порошків за вимогами статті ГФ ХІ	Критерії відповідності при перевірці якості ЛЗ «ex tempore» за вимогами наказу МОЗ України № 626	
					маса окремих доз	хімічний контроль
кількість одиниць фасовки або заготовки для аналізу	10 або 30	20	-	-	3-5	1
середня маса	для простих порошків не регламентується	300 мг і більше	-	від 0.31 г до 1.00 г	від 0.3 г до 1.0 г	від 0.5 г до 1.0 г
припустиме відхилення, %	≤15.0 %, за умови що $M = \bar{X}$ (98.5 % ≤ \bar{X} ≤ 101.5 %)	± 7.5 %	± 10.0 %	± 5.0 %	± 5.0 %	± 5.0 %
лікарський засіб витримав випробування, якщо	прийнятне число для перших 10 одиниць ≤15.0. Якщо умови не виконуються, випробуванню піддають наступні 30 одиниць. Обчислене кінцеве прийнятне число, розраховане із 30 одиниць, ≤15.0 і кожна індивідуальна маса відповідає рівнянню $75.0 \% \leq X_i \leq 125.0 \%$	не більше 2-х індивідуальних мас відхиляються від середньої маси більше ніж на ± 7.5 %, причому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси на $2 \times 7.5 = 15.0 \%$	відхилення у вмісті діючих речовин мають становити не більше (± 10.0 %) від вмісту, зазначеному у розділі «Склад», якщо немає інших зазначень в окремій статті	відхилення не перевищує критерій	відхилення не перевищує критерій	відхилення не перевищує критерій

Відносна похибка при зважуванні 0.5 г кислоти аскорбінової на вагах ВР-5 становить ± 0.8 %: абсолютна чутливість при 1/10 граничного навантаження дорівнює 0.004 г (4 мг), тому $0.004/0.5 \times 100 = 0.8 \%$.

Можливі втрати при розтиранні у ступці обчислювали шляхом множення величини втрати, встановленої для робочої поверхні ступки № 1 (аскорбінова кислота — 12 мг [11]), на коефіцієнт відповідного номера ступки (№ 7, $k = 17$), місткість якої близька до оптимального завантаження, тобто дорівнює $12 \times 17 = 204$ мг (0.204 г), або 0.41 % від загальної маси [11, 13].

Враховуючи незалежність вимірюваних величин, розраховали сумарну невизначеність проведених операцій. Тобто загальні теоретичні втрати при виготовленні цієї лікарської форми становитимуть ± 0.91 %:

$$\Delta_m = \sqrt{\Delta_{m_{50}}^2 + \Delta_{m_{0.5}}^2 + \Delta_S^2} = \sqrt{0.1^2 + 0.8^2 + 0.41^2} = 0.91 \% \quad [15, 16].$$

2. Експериментальна частина

Дослідження проводили, враховуючи рекомендації ОРА у рамках лабораторної Програми Контролю Якості (QC) результатів випробувань: при проведенні тестів і визначенні правильності й прецизійності у межах однієї партії (фасовки, одного набору зразків) проводити контрольне вимірювання кожного двадцятого зразка або 5 % зразків однієї партії. Цей рівень достатньо демонструє коректність результатів [17].

При проведенні дослідження використувувалась субстанція кислоти аскорбінової, що задовольняє вимоги ДФУ [6]. Для роботи використувувався мірний посуд класу А, реактиви,

Таблиця 2.1

Результати дослідження однорідності маси для одиниці дозованого лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.5.

Acidi ascorbinici 0.5; №100 (аптека №1, ложка-дозатор)							
№ п/п	$m_{зас., г}$	$m_{капс., г}$	$w_p, г$	$X_i, \%$, від номінального вмісту: $X_i = w_i / 0.5 \times 100$	Відхилення від середньої маси, % ($\bar{X} - X_i$)	Відхилення від номінальної маси, % ($100 - X_i$)	Критерій відхилень для одиниці маси дозованого ЛЗ, %
1.1.1.	0.9810	0.5187	0.4623	92.46	1.81	7.5	7.5
1.1.2.	0.9625	0.4913	0.4712	94.24	0.03	5.8	
1.1.3.	0.9874	0.4953	0.4921	98.42	-4.15	1.6	
1.1.4.	1.0109	0.5169	0.4940	98.80	-4.53	1.2	
1.1.5.	0.9846	0.5048	0.4798	95.96	-1.69	4.0	
1.1.6.	0.9673	0.5004	0.4669	93.38	0.89	6.6	
1.1.7.	1.0251	0.5381	0.4870	97.40	-3.13	2.6	
1.1.8.	1.0196	0.5115	0.5081	101.62	-7.35	-1.6	
1.1.9.	0.9941	0.4810	0.5131	102.62	-8.35	-2.6	
1.1.10.	0.9650	0.5064	0.4586	91.72	2.55	8.3	
1.1.11.	1.0005	0.5148	0.4857	97.14	-2.87	2.9	
1.1.12.	1.0051	0.5344	0.4707	94.14	0.13	5.9	
1.1.13.	0.9584	0.5211	0.4373	87.46	6.81	12.5	
1.1.14.	0.9990	0.5281	0.4709	94.18	0.09	5.8	
1.1.15.	0.9810	0.5305	0.4505	90.10	4.17	9.9	
1.1.16.	0.9742	0.5025	0.4717	94.34	-0.07	5.7	
1.1.17.	0.9588	0.5168	0.4420	88.40	5.87	11.6	
1.1.18.	0.9650	0.4921	0.4729	94.58	-0.31	5.4	
1.1.19.	0.9742	0.5401	0.4341	86.82	7.45	13.2	
1.1.20.	0.9898	0.5317	0.4581	91.62	2.65	8.4	
\bar{X}			0.4714	94.27		5.7	
вибіркове стандартне відхилення S			0.02	4.32			
відносне стандартне відхилення $RSD = 100 \times S / \bar{X} =$			4.58	4.58			
критерій для RSD складає $RSD = 15 / k(t(95; 19)) = 15 / 1.73$				8.67			

що відповідають вимогам ДФУ [6-8], аналітичні ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, ручні аптечні ваги ВР-100 та ВР-5, дозатори ТК-3, ДПР-1 та ДПР-2.

У різних аптеках було виготовлено за правилами аптечної технології простий дозований порошок складу:

Rp.: Acidi ascorbinici 0.5

Da tales doses № 100

Signa. По 1 порошку 3 рази на добу.

Технологія простих дозованих порошоків [11] полягає у тому, що спочатку відважують лікарський засіб із розрахунком на всю кількість прописаних порошоків, здрібнюють, а потім розважують його на окремі дози. Кислота аскорбінова – кристалічний порошок. Відважували 50.0 г (0.5×100) аскорбінової кислоти на ручних аптечних вагах ВР-100, тонко здрібнювали у ступці № 7 (оптимальне завантажен-

ня 42.0 г, час здрібнення 5 хв, коефіцієнт робочої поверхні 17) і розважували по 0.5 г у вощені капсули ложкою-дозатором або на ручних аптечних вагах ВР-5.

Дослідження однорідності маси для одиниці дозованого простого порошку, складу: кислоти аскорбінової по 0.5 за № 100 за вимогами статті ДФУ 2.9.5. [6] проводили за такою схемою.

Із 8 аптек різних областей України (Харківської, Луганської, Черкаської) було відібрано у різні дні після фасування різними фармацевтами ложкою-дозатором або вагами ВР-5 по 20 одиниць дозованого простого порошку (різні серії в одній аптеці: 1.1.1.-1.1.20., 1.2.1.-1.2.20.; в іншій аптеці: 2.1.1.-2.1.20. та ін.) за принципом: кожний п'ятий порошок (Схема 1). Далі точно зважували на аналітичних вагах марки METTLER TOLEDO АВ 204 S/A кожну не розпаковану капсулу. Далі розпаковували бумажну

Таблиця 2.2

Результати дослідження однорідності маси для одиниці дозованого лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.5.

Acidi ascorbinici 0.5, № 100 (аптека №1, ваги ВР-5)							
№ п/п	$m_{зар.}, г$	$m_{капс.}, г$	$w_p, г$	$X_i, \%$ від номінального вмісту: $X_i = w_i / 0.5 \times 100$	Відхилення від середньої маси, % ($\bar{X} - X_i$)	Відхилення від номінальної маси, % ($100 - X_i$)	Критерій відхилень для одиниці маси дозованого ЛЗ, %
1.2.1.	0.9724	0.4792	0.4932	98.64	-0.98	1.4	7.5
1.2.2.	0.9389	0.4539	0.4850	97.00	0.66	3.0	
1.2.3.	0.9409	0.451	0.4899	97.98	-0.32	2.0	
1.2.4.	0.9382	0.4563	0.4819	96.38	1.28	3.6	
1.2.5.	0.9265	0.4341	0.4924	98.48	-0.82	1.5	
1.2.6.	0.9321	0.4336	0.4985	99.70	-2.04	0.3	
1.2.7.	0.9311	0.4462	0.4849	96.98	0.68	3.0	
1.2.8.	0.9191	0.4276	0.4915	98.30	-0.64	1.7	
1.2.9.	0.9573	0.4676	0.4897	97.94	-0.28	2.1	
1.2.10.	0.9321	0.4349	0.4972	99.44	-1.78	0.6	
1.2.11.	0.9291	0.4418	0.4873	97.46	0.20	2.5	
1.2.12.	0.9478	0.4491	0.4987	99.74	-2.08	0.3	
1.2.13.	0.9566	0.4644	0.4922	98.44	-0.78	1.6	
1.2.14.	0.9552	0.4655	0.4897	97.94	-0.28	2.1	
1.2.15.	0.9281	0.4457	0.4824	96.48	1.18	3.5	
1.2.16.	0.9161	0.4285	0.4876	97.52	0.14	2.5	
1.2.17.	0.9358	0.4552	0.4806	96.12	1.54	3.9	
1.2.18.	0.9089	0.4331	0.4758	95.16	2.50	4.8	
1.2.19.	0.9223	0.4306	0.4917	98.34	-0.68	1.7	
1.2.20.	0.9217	0.4463	0.4754	95.08	2.58	4.9	
\bar{X}			0.4883	97.66		2.3	
вибіркове стандартне відхилення S			0.01	1.34			
відносне стандартне відхилення $RSD = 100 \times S / \bar{X} =$			1.38	1.38			
критерій для RSD складає $RSD = 15 / k(t(95; 19)) = 15 / 1.73$				8.67			

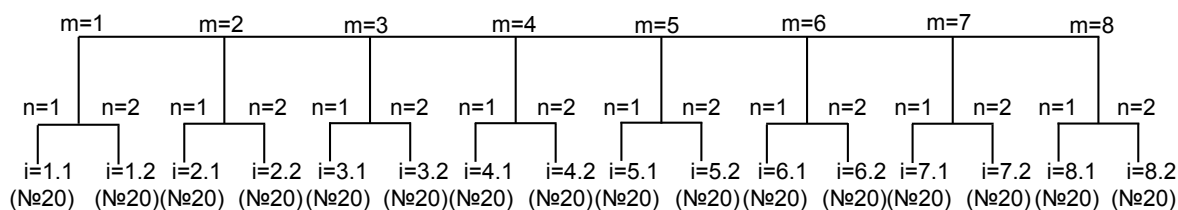
капсулу і зважували порожню капсулу. Масу вмісту знаходили, віднімаючи масу порожньої капсули від відповідної загальної маси: $w_i = m_{зар.} - m_{капс.}$. Для кожної серії фасовки розраховували величини: $X_i, \%$ (маса кожної капсули у відсотках до номінального значення, обчислена за формулою: $X_i = w_i / 0.5 \times 100$), середні значення \bar{X} , відхилення від середньої маси, у відсотках ($\bar{X} - X_i$), величину якого порівнювали із припустимим відхиленням, у відсотках, за вимогами статті ДФУ 2.9.5, тобто 7.5 %. Отримані результати та їх статистична обробка для кожної із восьми серій вимірювань було представлено у вигляді таблиць (зразок такої таблиці для аптеки № 1 при фасуванні ложкою-дозатором наведено в Табл. 2.1., вагами ВР-5 - в Табл. 2.2.) Далі статистичні характеристики кожної серії (фасування ложкою-дозатором та фасування

вагами ВР-5) було окремо зведено у загальну Табл. 3, та проведено визначення об'єднаних метрологічних характеристик: $\bar{X}_{об'єд.}, I_{об'єд.}, RSD_{об'єд.}$ для серій вимірювань.

Дослідження однорідності дозованих одиниць лікарської форми: кислоти аскорбінової по 0.5 за № 100 за вимогами статті ДФУ 2.9.40. проводили за такою схемою (Схема 2).

Кількісне визначення вмісту у відсотках $A_i, \%$ вихідної субстанції кислоти аскорбінової проводили на репрезентативному зразку кожної серії у кожній аптеці, використовуючи в якості підходячого аналітичного методу йодометричне титрування за методикою ДФУ [4]. Для кожної серії зразків (i) було отримано значення A_i , виражене у відсотках від номінального вмісту за формулою

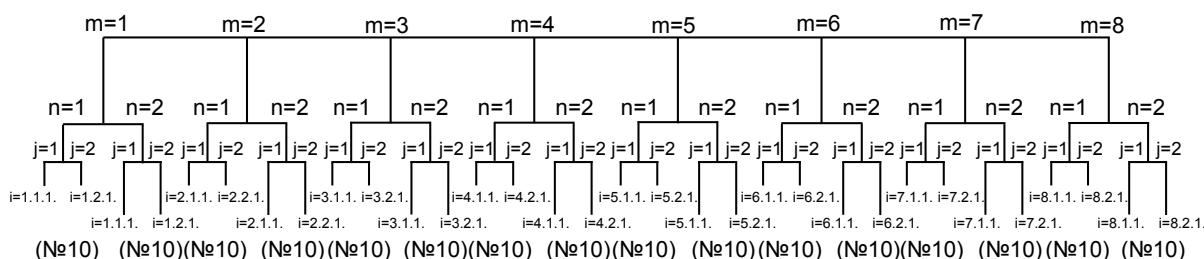
Схема 1



- m = 1...8 — аптеки;
- n = 1 — дозування порошків ложкою дозатором;
- n = 2 — розважування порошків вагами ВР-5;
- 20 — кількість відібраних капсул із кожної серії фасовки.

Схема експерименту при дослідженні однорідності маси одиниці дозованого лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.5.

Схема 2



- m = 1...8 — аптеки;
- n = 1 — дозування порошків ложкою дозатором;
- n = 2 — розважування порошків вагами ВР-5;
- j = 1,2 — дозування або розважування порошків в різні дні різними фармацевтами;
- 10 — кількість відібраних капсул із кожної серії фасовки.

Схема експерименту при дослідженні однорідності дозованих одиниць за вимогами статті ДФУ 2.9.40.

$$A_i = \frac{A_j \times \bar{W}_i}{0.5}$$

Далі, із кожної аптеки після фасування ложкою-дозатором або вагами ВР-5 у різні дні різними фармацевтами відбирали 10 дозованих одиниць (різні серії в аптеці №1: 1.1.1.1.-1.1.1.10., 1.1.2.1.-1.1.2.10., 1.2.1.1.-1.2.1.10., 1.2.2.1.-1.2.2.10.; в аптеці №2: 2.1.1.1.-2.1.1.10., 2.1.2.1.-2.1.2.10., 2.2.1.1.-2.2.1.10., 2.2.2.1.-2.2.2.10. та ін.) за принципом: кожний десятий порошок (Схема 2). Потім точно зважували кожен наповнену бумажну капсулу на аналітичних вагах марки METTLER TOLEDO AB 204 S/A, а також кожен порожнену капсулу й розраховували для кожної капсули масу вмісту, віднімаючи масу капсули від відповідної загальної маси: $m_{зар.} - m_{капс.} = w_i$. Індивідуальний розрахунковий вміст (X_i) у випробуваних дозованих одиницях розраховували за формулою [6]:

$$w_i \times \frac{A_i}{\bar{W}_i}$$

де:

w_i — індивідуальна маса випробовуваних дозованих одиниць;

A_i — вміст діючої речовини (у відсотках до номінального значення) в одиниці дозованого лікарського засобу в межах однієї серії;

\bar{W}_i — середнє значення індивідуальних мас для кожної серії вимірювань.

Для кожної серії відібраних капсул (різні аптеки, різні дні, різні фармацевти) розраховували вибіркоче стандартне відхилення S , відносне стандартне відхилення RSD , приймальне число AV . Приймальне число AV для кожної серії обчислювали за формулою: $|M - \bar{X}| + k \times S$, враховуючи величину середнього значення для кожної серії при визначенні опорного значення M згідно рекомендаціям ДФУ [8].

Отримані результати та їх статистична обробка для кожної із восьми серій вимірювань було представлено у вигляді таблиць (зразок такої таблиці для аптеки № 1 при фасуванні ложкою-дозатором наведено в Табл. 4.1., вагами ВР-5 - в Табл. 4.2.) Далі статистичні характеристики кожної серії (фасування ложкою-дозатором та вагами ВР-5) було окремо зведено у загальну Табл. 5 та проведено визначення об'єднаних метрологічних характеристик: $\bar{X}_{об'єд.}$, $S_{об'єд.}$, $RSD_{об'єд.}$, $AV_{об'єд.}$ для серій вимірювань.

Таблиця 3

Результати дослідження однорідності маси дозованих одиниць простих порошків за вимогами статті ДФУ 2.9.5., виготовлених у 8 аптеках різних областей України

ложка-дозатор											
№ фасовки	код аптеки	Кількість індивідуальних мас, що відхиляються від середньої маси більше ніж на $\pm 7.5\%$	\bar{X} середнє, %	$S(x_i)$, %	$RSD(x_i)$, %	$\Delta k = t(95,19) \cdot S = 1,73 \cdot S$	Кількість індивідуальних мас, що відхиляються від номінальної маси більш ніж $\pm 7,5\%$	Кількість індивідуальних мас, що виходять за межі (85-115) %, від зазначеного у розділі «Склад»	Кількість індивідуальних мас, що відхиляються від номінальної маси більше ніж на $\pm 5.0\%$	Кількість індивідуальних мас, що відхиляються від номінальної маси більше ніж на $\pm 10.0\%$	
1.1.	1	1	94.27	4.32	4,58	7,92	6	немає	12	3	
2.1.	2	2	95.20	4.84	5,09	8,80	9	немає	10	2	
3.1.	3	2	94.70	4.51	4,76	8,24	6	немає	12	3	
4.1.	4	1	97.73	3.81	3,89	6,74	1	немає	5	1	
5.1.	5	1	96.71	3.78	3,91	6,76	3	немає	6	1	
6.1.	6	2	95.47	4.89	5,12	8,85	5	немає	8	3	
7.1.	7	немає	95.07	3.00	3,16	5,46	4	немає	10	немає	
8.1.	8	2	97.64	3.90	3,99	6,91	1	немає	7	1	
середнє			95.85								
стандартне відхилення S			1.34								
відносне стандартне відхилення RSD			1.39								
величини об'єднаних метрологічних характеристик					4,23	4,42	7,29				
ваги ВР-5											
1.2.	1	немає	97.66	1.34	1.38	2.38	немає	немає	немає	немає	
2.2.	2	немає	98.62	0.78	0.79	1.36	немає	немає	немає	немає	
3.2.	3	немає	99.68	2.07	2.08	3.60	немає	немає	1	немає	
4.2.	4	1	97.90	2.66	2.72	4.71	1	немає	1	немає	
5.2.	5	немає	100.78	0.63	0.62	1.08	немає	немає	немає	немає	
6.2.	6	немає	98.58	2.48	2.51	4.35	немає	немає	3	немає	
7.2.	7	немає	96.93	1.64	1.69	2.92	немає	немає	3	немає	
8.2.	8	немає	99.10	0.80	0.80	1.39	немає	немає	немає	немає	
середнє			98.66								
стандартне відхилення S			1.21								
відносне стандартне відхилення RSD			1.23								
величини об'єднаних метрологічних характеристик					1,77	1,80	2,97				

2. Результати та їх обговорення

2.2. Результати обчислення однорідності маси за вимогами статті ДФУ 2.9.5. [6]

У Табл. 2.1. і 2.2. наведено зразок обчислення результатів дослідження якості дозування лікарської форми в аптеці № 1 ложкою-дозатором та вагами ВР-5 за вимогами статті

ДФУ 2.9.5. Критерієм відповідності на однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу є умови: лікарський засіб витримав випробування, якщо не більше 2-х індивідуальних мас відхиляються від середньої маси більше ніж на $\pm 7.5\%$, при цьому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси більше ніж на $2 \times 7.5 = 15.0\%$. Про якість

Таблиця 4.1

Результати дослідження однорідності маси для одиниці дозованого за допомогою ложки-дозатора лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.40.

Розрахунок за статтею ДФУ 2.9.40 (аптека № 1, ложка-дозатор, фармацевт 1)					
№ п/п	$m_{заг.}, \Gamma$	$m_{капс.}, \Gamma$	w_i, Γ	Індивідуальний розрахунковий вміст у випробуваних дозованих одиницях $x_i = w_i \times A / \bar{W}$	Відхилення від номінальної маси, % $(100 - X_i)$
1.1.1.1.	0.9700	0.5025	0.4675	93.03	6.97
1.1.1.2.	0.9583	0.4999	0.4584	91.22	8.78
1.1.1.3.	0.9832	0.5260	0.4572	90.98	9.02
1.1.1.4.	1.0067	0.5334	0.4733	94.19	5.81
1.1.1.5.	0.9804	0.5114	0.4690	93.33	6.67
1.1.1.6.	0.9631	0.5085	0.4546	90.47	9.53
1.1.1.7.	1.0209	0.5577	0.4632	92.18	7.82
1.1.1.8.	1.0254	0.5108	0.5146	102.41	-2.41
1.1.1.9.	1.0177	0.5328	0.4849	96.50	3.50
1.1.1.10	0.9608	0.5029	0.4579	91.12	8.88
$\bar{W} =$			0.4701		
$A = 99.5 \times \bar{W} / 0.5 =$			93.54		
$\bar{X} =$				93.54	5.96
$S =$				3.61	
$RSD = 100 \times S / \bar{X} =$				3.86	
$\bar{X} \leq 98.5 \%$, тому $M = 98.5$; $AV = (98.5 - \bar{X}) + 2.4 \times S$				13.62	
критерій для RSD дорівнює $S = (15 - (98.5 - \bar{X})) / 2.4$				4.18	

Таблиця 4.2

Результати дослідження однорідності маси для одиниці дозованого за допомогою вагів ВР-5 лікарського засобу за вимогами статті ДФУ 2.9.40.

Розрахунок за статтею ДФУ 2.9.40 (аптека № 1, ваги ВР-5, фармацевт 1)					
№ п/п	$m_{заг.}, \Gamma$	$m_{капс.}, \Gamma$	w_i, Γ	Індивідуальний розрахунковий вміст у випробуваних дозованих одиницях $x_i = w_i \times A / \bar{W}$	Відхилення від номінальної маси, % $(100 - X_i)$
1.2.1.1.	1.0316	0.5394	0.4922	97.95	2.05
1.2.1.2.	1.0108	0.5302	0.4806	95.64	4.36
1.2.1.3.	1.0140	0.5260	0.4880	97.11	2.89
1.2.1.4.	1.0002	0.5313	0.4689	93.31	6.69
1.2.1.5.	1.0041	0.5168	0.4873	96.97	3.03
1.2.1.6.	0.9874	0.5086	0.4788	95.28	4.72
1.2.1.7.	1.0063	0.5212	0.4851	96.53	3.47
1.2.1.8.	1.0031	0.5207	0.4824	96.00	4.00
1.2.1.9.	1.0253	0.5426	0.4827	96.06	3.94
1.2.1.10	0.9839	0.5081	0.4758	94.68	5.32
$\bar{W} =$			0.4822		
$A = 99.5 \times \bar{W} / 0.5 =$			95.95		
$\bar{X} =$				95.95	4.05
$S =$				1.33	
$RSD = 100 \times S / \bar{X} =$				1.38	
$\bar{X} \leq 98.5 \%$, тому $M = 98.5$; $AV = (98.5 - \bar{X}) + 2.4 \times S$				5.73	
критерій для RSD дорівнює критерій для RSD дорівнює $S = (15 - (98.5 - \bar{X})) / 2.4$				5.19	

виготовлення судять, порівнюючи відхилення від середньої маси із зазначеними критеріями.

Так, за результатами визначення однорідності маси для одиниці дозованого лікарського за-

Таблиця 5

Результати дослідження однорідності дозованих одиниць простих порошків за вимогами статті ДФУ 2.9.40., виготовлених у 8 аптеках різних областей України

Ложка-дозатор							Ваги ВР-5						
№ фасовки	код аптеки	\bar{X} %	S(x _i) %	RSD(x _j) %	Критерій для RSD	AV	№ фасовки	код аптеки	\bar{X} %	S(x _i) %	RSD(x _j) %	Критерій для RSD	AV
1.1.1.	1	93.54	3.61	3.86	4.18	13.62	1.2.1.	1	95.95	1.33	1.38	5.19	5.73
1.1.2.		92.03	1.24	1.35	3.55	9.46	1.2.2.		96.42	1.32	1.37	5.38	5.25
2.1.1.	2	94.88	2.39	2.52	4.74	9.35	2.2.1.	2	98.10	0.68	0.69	6.08	2.02
2.1.2.		96.61	1.94	2.01	5.46	6.55	2.2.2.		98.48	0.77	0.78	6.24	1.86
3.1.1.	3	97.99	2.09	2.13	6.04	5.53	3.2.1.	3	97.82	3.44	3.51	5.97	8.92
3.1.2.		98.88	4.05	4.09	6.41	9.34	3.2.2.		96.84	1.16	1.20	5.56	4.46
4.1.1.	4	99.21	1.31	1.32	6.55	2.43	4.2.1.	4	99.13	2.40	2.42	6.25	5.76
4.1.2.		98.70	1.73	1.75	6.34	3.94	4.2.2.		99.75	1.71	1.71	6.25	4.10
5.1.1.	5	100.60	7.41	7.36	6.25	17.78	5.2.1.	5	98.82	1.92	1.94	6.25	4.61
5.1.2.		98.24	1.87	1.90	6.14	4.75	5.2.2.		97.20	2.87	2.95	5.71	8.18
6.1.1.	6	98.93	2.09	2.11	6.25	5.02	6.2.1.	6	100.95	0.56	0.56	6.25	1.35
6.1.2.		97.46	5.74	5.89	5.82	14.82	6.2.2.		100.42	0.69	0.69	6.25	1.66
7.1.1.	7	90.33	2.07	2.29	2.85	13.13	7.2.1.	7	97.72	0.83	0.85	5.93	2.77
7.2.2.		93.75	3.66	3.91	4.27	13.54	7.2.2.		97.93	0.97	0.99	6.01	2.90
8.1.1.	8	96.29	4.15	4.31	5.33	12.18	8.1.1.	8	97.60	1.19	1.22	5.87	3.75
8.1.2.		98.84	3.13	3.17	6.25	7.52	8.2.2.		95.89	1.70	1.78	6.25	4.09
$\bar{X}_{об'єг}$		96.64					$\bar{X}_{об'єг}$		98.06			4.02	
S		2.93					S		1.49				
RSD		3.03					RSD		1.52				
значення об'єднаних метрологічних характеристик			3.45	3.53		10.27				1.68	1.71		4.72
<i>Кількість індивідуальних мас, приймальне число яких менше або дорівнює L1 (L1=15.0)</i>													

собу для аптеки № 1 як для ложки-дозатора (1 відхилення від середньої маси становить більше ніж $\pm 7.5\%$), так і для вагів ВР-5 (жодного відхилення) можна зробити висновок про відповідність якості виготовлення лікарського засобу вимогам статті ДФУ 2.9.5.

Відзначимо, що при проведенні випробування за вимогами цієї статті величина відхилення від номінального вмісту не враховується. Хоча, для простих дозованих порошків вона водночас являє собою і кількісний вміст дозованого лікарського засобу.

Вимоги статті 2.9.5. не регламентують і припустиму величину відносного стандартного відхилення (RSD) дозування, яка статистично більш коректна, та більш стійка до грубих випадкових похибок. Отримані статистичні дані та результати порівняння для кожної серії дозованого лікарського засобу наведено в Табл. 3. Результати порівняння відхилень індивідуальних мас від середньої у кожній серії вимірювань свідчать, що як ложка-дозатор, так і ручні аптечні ваги дозволяють коректно проводити дозування порошкової маси, що за своїми фізико-хімічними властивостями (насіпний об'єм, плинність то-

що) близька до аскорбінової кислоти. Водночас, необхідно відмітити, що більш точним та правильним є дозування за масою ($\bar{X}_{об'єг} = 98.66\%$, $S_{об'єг} = 1.77\%$, $RSD_{об'єг} = 1.80\%$, відносний довірчий інтервал дорівнює $\Delta k = 2.97\%$), ніж дозування за об'ємом ($\bar{X}_{об'єг} = 95.85\%$, $S_{об'єг} = 4.23\%$, $RSD_{об'єг} = 4.42\%$, відносний довірчий інтервал дорівнює $\Delta k = 7.29\%$).

Оскільки для простих порошків вміст однодозового контейнеру дорівнює вмісту діючої речовини, було цікаво прорахувати кількість індивідуальних мас, що відхиляються від номінального вмісту більше ніж на $\pm 5\%$ (вимоги наказу № 626), $\pm 10\%$ (вимоги ДФУ) (Табл. 3). При дозуванні ложкою-дозатором серед усіх серій наявні індивідуальні маси, що перевищують припустимі межі вмісту діючої речовини більше ніж на $\pm 5\%$ [9], $\pm 10\%$ [8]. При дозуванні за масою індивідуальні маси, що перевищують межу $\pm 10\%$ [8], відсутні, межу $\pm 5\%$ [9] перевищують лише 1-3 індивідуальні маси у чотирьох серіях.

Тобто, у той час як відхилення від середньої маси відповідає вимогам ДФУ, відхилення від номінальної маси для деяких порошків розфа-

Рисунок 1

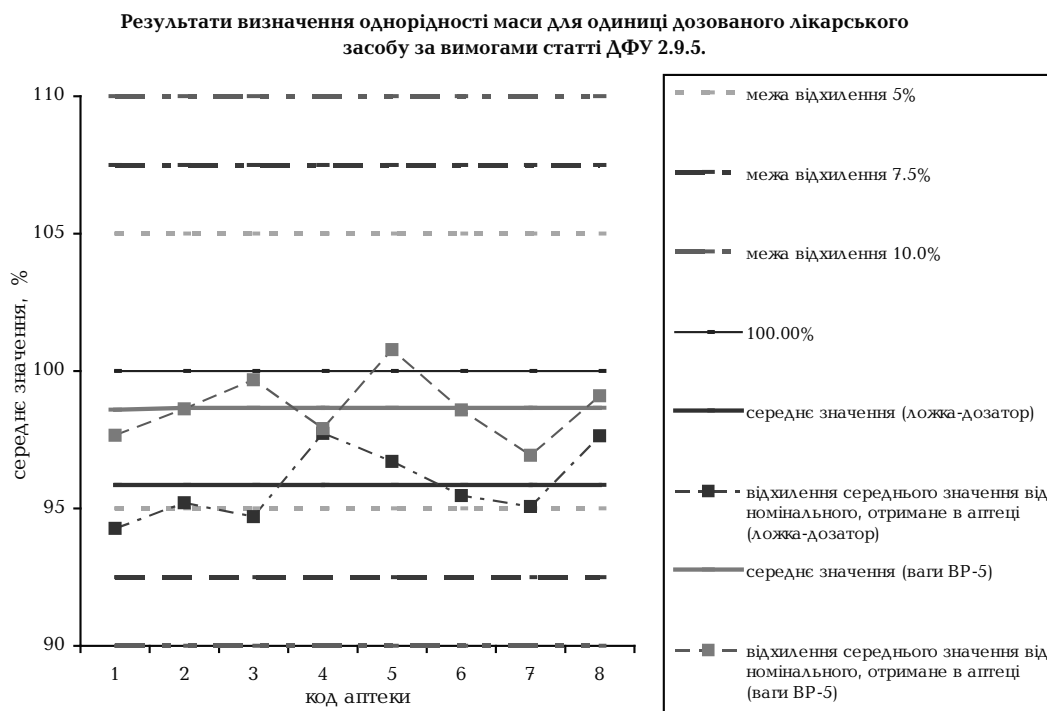
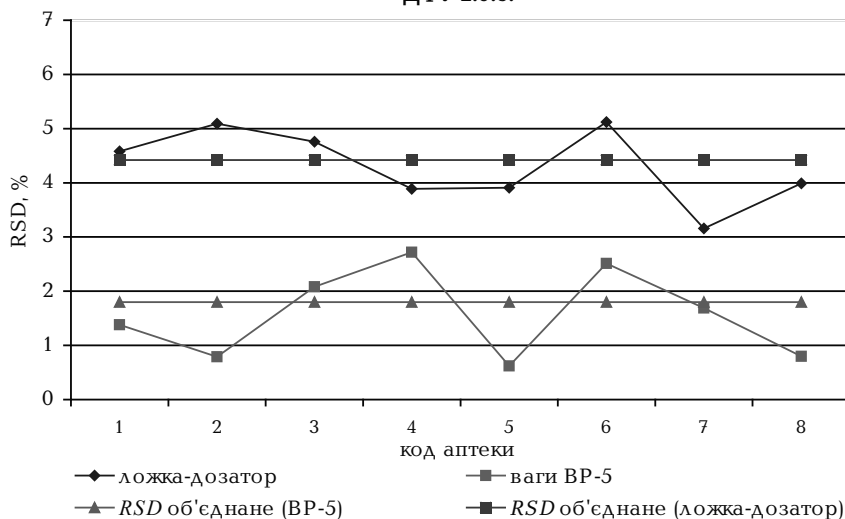


Рисунок 2

Значення відносного стандартного відхилення індивідуальних мас дозованих одиниць лікарського засобу при визначенні однорідності маси за вимогами статті ДФУ 2.9.5.



сованих ложкою-дозатором значно перевищують припустиме відхилення для вмісту діючої речовини.

Як бачимо із Рис. 1, величина об'єданого середнього для серії вимірювань ложкою-дозатором досить близька до граничного значення $\pm 5\%$ для кількісного вмісту, до того ж 2 із розрахованих середніх нижче зазначеної величини, тобто не відповідають вимогам наказу № 626. Водночас, усі одержані середні величи-

ни відповідають вимогам національної частини «Приготування порошків «ex tempore» загальної статті на лікарські форми «Порошки для орального застосування» — не перевищують граничного значення $\pm 10\%$.

2.3. Результати обчислення однорідності маси за вимогами статті ДФУ 2.9.40. [8]

Результати дослідження однорідності маси для одиниці дозованого лікарського засобу за

вимогами статті ДФУ 2.9.40. наведено в Табл. 4.1.-4.2. У статті ДФУ 2.9.40. до регламентації за граничними значеннями додається регламентація за відносним стандартним відхиленням (RSD), критерії однорідності вмісту також є однаковими, незалежно від дозування. Відповідно до статті ДФУ 2.9.40. випробування однорідності дозованих одиниць простих порошків проводять розрахунково-ваговим методом (РВМ). При цьому проводять визначення однорідності маси із перерахунком маси кожної одиниці на вміст діючої речовини у відсотках від середнього значення індивідуальних мас (\bar{W}) у межах однієї серії, із використанням результатів, отриманих в результаті кількісного визначення. Критерієм відповідності на якість виготовлення лікарського порошку при цьому визначенні на однорідність дозованих одиниць є приймальне число ($AV = |M - \bar{X}| + k \times S$), що розраховується для кожної конкретної серії лікарського засобу та не має перевищувати 15 ($L1 = 15.0\%$, $AV \leq L1$) із урахуванням величини вмісту діючої речовини за результатами кількісного визначення. Приймальне число є фактично довірчим інтервалом, що враховує зміщення розподілу $|M - \bar{X}|$ відносно опорного значення M .

Результати дослідження усіх серій вимірювань на однорідність дозованих одиниць за вимогами статті ДФУ 2.9.40. (Табл. 5, Рис. 3) свідчать, що розраховане приймальне число для кожної серії вимірювань, виключаючи тільки серію 5.1.1., не перевищує критерій. Тобто як ложка-дозатор, так і ручні аптечні ваги дозво-

ляють коректно проводити дозування порошкової маси, що має насипний об'єм, менший або близький до аскорбінової кислоти. До того ж дозування, проведене ручними аптечними вагами ВР-5, має значно кращі метрологічні характеристики ($\bar{X}_{об'єг.} = 98.06\%$, $S_{об'єг.} = 1.68\%$, $RSD_{об'єг.} = 1.71\%$, $AV_{об'єг.} = 4.72\%$), ніж дозування ложкою-дозатором ($\bar{X}_{об'єг.} = 96.64\%$, $S_{об'єг.} = 3.45\%$, $RSD_{об'єг.} = 3.53\%$, $AV_{об'єг.} = 10.27\%$).

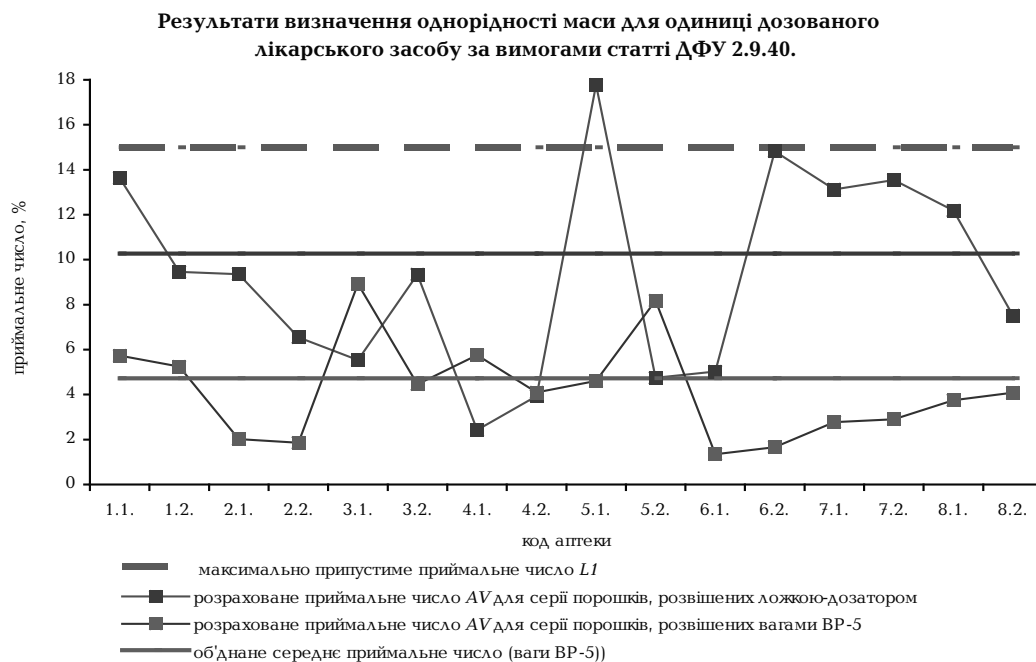
За результатами визначення в кожній із аптек величина \bar{X} для усіх серій вимірювань також не перевищує припустимі межі ($\pm 10\%$) до вмісту діючої речовини та відповідає вимогам ДФУ [8]. Щодо вимог Наказу № 626 [9] величина середнього значення \bar{X} при дозуванні ложкою-дозатором для 5 серій перевищує припустиму межу $\pm 5\%$, при дозуванні вагами ВР-5 вимоги цього Наказу виконуються.

Висновки

Вперше в умовах аптек різних областей України проведено визначення метрологічних характеристик одного з технологічних процесів виготовлення екстемпоральних простих порошків — дозування. Визначення проводили відповідно до вимог Державної Фармакопеї України. Оцінку отриманих результатів проводили відповідно до вимог ДФУ, Наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження правил виготовлення лікарських засобів в умовах аптек» та статті ГФ XI.

Метрологічні характеристики процесу дозування відповідно до вимог статті ДФУ 2.9.40.

Рисунок 3



в умовах аптек України за масою дорівнюють $RSD_{об'єг.} = 1.71\%$, $AV_{об'єг.} = 4.72\%$; за об'ємом — $RSD_{об'єг.} = 3.53\%$, $AV_{об'єг.} = 10.27\%$, та не перевищують припустимих ДФУ [8] меж відхилення при виготовленні порошків «ex tempore».

Якість дозування у значній мірі залежить від технологічних властивостей порошкової маси, тобто фізико-хімічні властивості лікарських речовин по-різному впливають на прецизійність маси і точність дозування лікарського препарату.

Для категорії екстемпоральних порошків, виготовлених за рецептом лікаря для конкретного пацієнта або за замовленням лікувально-профілактичного закладу, тобто які готують під наглядом за загальними принципами аптечної технології, та для яких звичайно не вивчають фізико-хімічні властивості порошкової маси, бажано дозування за масою — ручними аптечними вагами. Вони також не підлягають фізичному та хімічному контролю. Однак, виключення можуть складати лікарські речовини, насипний об'єм яких нижче або дорівнює об'єму кислоти аскорбінової ($1.15 \text{ см}^3/\text{г}$).

Для другої категорії екстемпоральних порошків, що виготовляються про запас, у процесі розробки технологічних інструкцій, якщо дозування планується проводити за об'ємом, слід визначати фізико-хімічні властивості порошкової маси (насипний об'єм, плинність тощо). У разі фасування за об'ємом також слід проводити визначення якості дозування на відповідність вимогам ДФУ. При дозуванні конкретною ложкою-дозатором слід перевіряти масу на вагах (наприклад, при фасуванні порошків за № 100 перевіряти кожній двадцятій).

Визначення одиниці дозованих одиниць краще проводити за вимогами статті ДФУ 2.9.40.: по-перше, для випробування необхідно 10 одиниць фасовки, по-друге, розрахунок проводиться з урахуванням кількісного вмісту діючої речовини, до регламентації за граничними значеннями додається регламентація за відносним стандартним відхиленням (RSD), що є статистично більш коректною. До того ж вимоги цієї статті, у цілому, більш ліберальні у порівнянні з вимогами наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження правил виготовлення лікарських засобів в умовах аптек» та статті ГФ ХІ.

За результатами аналізу отриманих метрологічних характеристик можна зробити висновок про відповідність якості досліджуваного виготовленого лікарського засобу вимогам статтям ДФУ 2.9.5. та 2.9.40., а також, що більш точним і правильним є дозування за масою, ніж дозування за об'ємом.

Одержані метрологічні характеристики при дозуванні ложкою-дозатором щодо вмісту діючої речовини значно перевищують вимоги Наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження правил виготовлення лікарських засобів в умовах аптек». Більш суворі вимоги цього Наказу для екстемпоральних порошків у порівнянні з вимогами ДФУ, на наш погляд, упереджені і потребують узгодження із ДФУ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Перспективи розвитку аптечної служби України з огляду на можливу євро інтеграцію / Громовик Б.П., Мокрянин С.М., Терещук С.І., Мірошникова І.О. // Фармацевтичний журнал. — 2007. - № 1. — С. 3-9.
2. Немченко А.С., Гавриленко А.Н. Организационно-экономические аспекты изготовления лекарственных средств в аптеках // Провизор. — 2002. - № 10. — С. 5-10.
3. Тихонов О.І., Ярних Т.Г. Сучасний стан і перспективи екстемпорального приготування ліків в умовах аптек // Фармац. журн. - № 5. — 2004. — С. 40-46.
4. PIC/S. Guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments. - PIC/S Secretariat: PE 010-2, 2008. — 46 p.
5. The United States Pharmacopoeia. - XXX ed. — 2007. — Electronic version. — 3503 p.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1. — 2004. — 520 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
9. Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (зі змінами та доповненнями) Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки // Юридичні аспекти фармації. — Харків, 2006. — Т. 3. — С. 49-59.
10. Наказ МОЗ України №197 від 07.09.1993 р. Про затвердження Інструкції по приготуванню в аптеках лікарських форм із рідким дисперсійним середовищем // Юридичні аспекти фармації. — Харків, 2006. — Т. 3. — С. 37-44.
11. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек / За ред. проф. О.І. Тихонова, проф. Т.Г. Ярних. — К.: МОЗ України, 2005. — 98 с.
12. Вимоги до виготовлення стерильних лікарських засобів в умовах аптек / За ред. проф. О.І. Тихонова, проф. Т.Г. Ярних. — К.: МОЗ України, 2005. — 76 с.
13. Навчальний посібник з аптечної технології ліків / Тихонов О.І., Ярних Т.Г., Гудзенко О.П. та ін. / За ред. акад. О.І. Тихонова. - Х.: Основа, 1998. — 336 с.
14. Общие статьи Государственной Фармакопеи Украины на экстемпоральные лекарственные средства. / Черных В.П., Тихонов А.И., Ярних Т.Г., Терно И.С., Товмасын Э.К., Тихоненко Т.М., Бондарева Л.В., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. // Фармаком. — 2007. - № 3. — С. 1-8.
15. Дворкин В.И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа. — М.: Химия, 2001. — 263 с.
16. Quantifying Uncertainty of Measurement / EURACHEM/ CITAC Guide. — 2000. — 120 p.
17. ORA-LAB.5.9. Assuring the quality of test results: Version 1.1. [10-01-03] // <http://web.ora.fda.gov/dfs/policies/manuals/default.htm>

Резюме

Евтифеева О.А., Георгианц В.А., Савченко Л.П.

Изучение однородности массы простых порошков, приготовленных в аптечных условиях, на соответствие требованиям Государственной Фармакопеи Украины

Впервые в условиях аптек разных областей Украины проведено определение метрологических характеристик одного из технологических процессов приготовления extemporальных порошков – дозирования – в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ). Испытание на однородность массы дозированных единиц было проведено в соответствии со статьями ГФУ 2.9.5. и 2.9.40. Полученные объединенные метрологические характеристики процесса дозирования, как по массе ($RSD_{об.сд.} = 1.71\%$), так и по объёму ($RSD_{об.сд.} = 3.53\%$), свидетельствуют, что качество приготовления простых порошков в аптечных условиях соответствуют требованиям ГФУ.

Summary

Yevtifeyeva O.A., Georgiyants V.A., Savchenko L.P.

Study of the uniformity if mass of extemporal single powders for the compliance to requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine

For the first time in pharmacies of different regions of Ukraine determination of metrological characteristics of the

one of technological processes of the preparation of extemporal single powders – dosing – according to requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) was conducted. A test of the uniformity of mass of dosing units according requirements of SPU monographs 2.9.5 and 2.9.40 was conducted. Obtained combined metrological characteristics of dosing process according to the mass ($RSD_{comb.} = 1.71\%$) and volume ($RSD_{comb.} = 3.53\%$) have showed that the quality of extemporal single powders corresponded to SPU requirements.

Евтіфеева Ольга Анатоліївна. К.фарм.н. (1999). Доцент кафедри якості, стандартизації та сертифікації лікарських засобів ІПКСФ НФаУ (2005).

Георгіанц Вікторія Акіпівна. Д.фарм.н. (2005). Професор. Зав. кафедри якості, стандартизації та сертифікації лікарських засобів ІПКСФ НФаУ (2004).

Савченко Олеся Петрівна. Закінчила НФаУ (2007). Аспірант кафедри якості, стандартизації та сертифікації лікарських засобів ІПКСФ НФаУ (2007).

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 615.015.32:615.11(477)

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

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции»

Валидация методик анализа препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением»

Для анализа препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением. 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» использована фармакопейная методика количественного определения беклометазона дипропионата методом ВЭЖХ и проведена ее валидация по следующим характеристикам: специфичность, правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения. Методика количественного определения беклометазона дипропионата валидирована в диапазоне применения от 15 % до 140 %, что включает также концентрации, используемые при испытаниях «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность дозы» и «Количественное определение. Беклометазона дипропионат». На основании расчета полной неопределенности показано, что методика соответствует критериям пригодности для количественного определения беклометазона дипропионата в препаратах и будет давать корректные результаты в других лабораториях. Показано соответствие разработанного препарата фармакопейным требованиям. При определении неспецифических примесей методом ВЭЖХ для препарата адаптирована и использована соответствующая фармакопейная методика и проведена ее валидация по характеристикам специфичность и предел обнаружения.

Бронхиальная астма (БА) является одной из важнейших медико-социальных проблем, что обусловлено высокой заболеваемостью и смертностью, а также значительными экономическими потерями. Распространенность БА во многих странах мира составляет (5-7) %, в некоторых регионах — 15 % [1]. Сегодня бронхиальную астму рассматривают как хронический воспалительный процесс, от степени выраженности которого зависят тяжесть клинического течения и исход заболевания, что определяет

необходимость своевременной, адекватной и последовательной противовоспалительной и бронхолитической терапии препаратами с разным механизмом действия [2].

Наиболее эффективными препаратами для базисной терапии, направленной на устранение воспаления, являются глюкокортикостероиды (ГК), оказывающие влияние на все фазы воспалительного процесса в дыхательных путях [3]. Предпочтительным является применение ГК в форме ингаляции, что способствует достиже-

нию их максимальной концентрации в очаге воспаления — в легких, а также вызывает минимальное проявление системных эффектов [4]. В клинической практике из ингаляционных ГК в настоящее время применяют беклометазона дипропионат, флунисолид, триамцинолон, будесонид и флутиказон [14]. Беклометазона дипропионат рассматривают как «золотой стандарт» среди ингаляционных ГК. Препарат обладает сильным местным противовоспалительным действием. Эффективность беклометазона дипропионата в значительной мере обусловлена его сродством к глюкокортикоидным рецепторам и низкой системной биодоступностью. По этим показателям он уступает только флутиказону [5]. Беклометазон, ингаляция под давлением (аэрозоль для ингаляции), содержащий беклометазона дипропионат (50 мкг/доза), отнесен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к основным лекарственным средствам для лечения бронхиальной астмы [6].

В связи с высокой медико-социальной значимостью постоянно совершенствуются и ужесточаются требования к качеству ингаляционных лекарственных форм, субстанции беклометазона дипропионата и ингаляций под давлением, содержащих беклометазона дипропионат, что находит отражение в общих статьях и монографиях ведущих Фармакопей и Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) [7, 8, 9, 10, 19, 20]. В первую очередь, это относится к испытаниям, коррелирующим с эффективностью терапевтического действия препарата (количественное определение беклометазона дипропионата в одной дозе, однородность дозирования, осаждение дозы мелкодисперсных частиц в нижней камере устройства А) и безопасностью (идентификация, сопутствующие примеси).

С одной стороны, фармакопейные методики анализа с каждым новым изданием Фармакопеи становятся более сложными и многообразными, с другой стороны, аналитические методики, включенные в фармакопейные монографии, валидированы. Однако эти методики разработаны без учета состава вспомогательных веществ данного препарата, его 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 данный состав не приводит к ухудшению правильности, линейности или прецизионности методики, а вспомогательные вещества не влияют на ее специфичность. Нельзя без экспериментального подтверждения предпола-

гать, что фармакопейная методика или испытание будут давать корректные результаты для препарата с иным составом, чем тот, который использовался для валидации фармакопейных методик и испытаний [11, 12]. Для препаратов-генериков часто требуется модификация фармакопейных методик и, соответственно, их валидация в необходимом объеме [13]. Фактически использование фармакопейных методик анализа для конкретного препарата становится актуальной задачей, которая требует правильного научного решения.

Нами был разработан препарат-генерик «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» — аналог инновационного препарата «Беклазон Эко, аэрозоль для ингаляций» («Norton Healthcare», Великобритания) [14], который содержит беклометазона дипропионат в виде раствора, этанол (96 %) и экологически безопасный пропеллент — хладон 134а (1,1,1,2-тетрафторэтан). В основу методик анализа препарата с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были положены фармакопейные аналитические методики [9, 10].

Целью настоящей статьи является представление некоторых результатов испытаний качества разработанного препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» с использованием фармакопейных методик, а также результатов их валидации.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований использовали разработанный нами препарат «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза». Препарат по 200 доз (по 18.75 мл) помещен в баллоны алюминиевые моноблочные производства фирмы «Linhardt GmbH & Co KG» (Германия) (типа D 22.0 DDG-58) с внутренней защитой, герметизированные дозирующим клапаном типа 20 DR 376/75/0-PT, и снабжен насадкой-ингалятором с защитным колпачком типа V05.1227 + V20.94 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия).

В работе использовали субстанцию беклометазона дипропионата производства фирмы «Crystal Pharma» (Испания), соответствующую требованиям монографии «Beclometasone dipropionate» Европейской Фармакопеи [9]; этанол (96 %) [15]; хладон 134а производства фирмы «DuPont» (торговые марки Freon 134а, SUVA-134а); стандартные образцы (СО) беклометазона дипропионата (*EP CRS* и *USP RS*, кат. № 04850),

СО беклометазона 17-пропионата (*EP CRS*) и беклометазона 21-пропионата (*EP CRS*).

Аналитические испытания методом ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы «Shimadzu» следующей комплектации: насос LC-20-AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат СТО-20АС, системный контроллер СВМ-20Alite, смеситель потока подвижной фазы высокого давления. Отбор проб для теста «Доза мелкодисперсных частиц» проводили с использованием стеклянного импинджера (устройство А) [8] и оборудования фирмы «Ereweka»: (вакуумный насос типа HVP 1000, измеритель потока воздуха типа DFM 2) по установленной методике [8, 10].

Количественное определение беклометазона дипропионата проводили в следующих условиях [10]: хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 250 мм × 4.6 мм, заполненная сорбентом Symmetry Shield с размером частиц 5 мкм производства фирмы «Waters»; подвижная фаза: ацетонитрил Р – вода Р (60:40); скорость потока подвижной фазы

1 мл/мин; детектирование при длине волны 238 нм; температура колонки 30 °С. В этих же условиях проводили контроль содержания посторонних примесей.

Хроматографирование проводили, получая не менее 3 хроматограмм, при условии выполнения требований к относительному стандартному отклонению ($RSD_{max} = 2.68$), указанных в ГФУ (2.2.46, N, Табл. 2.2.46.-2) [16].

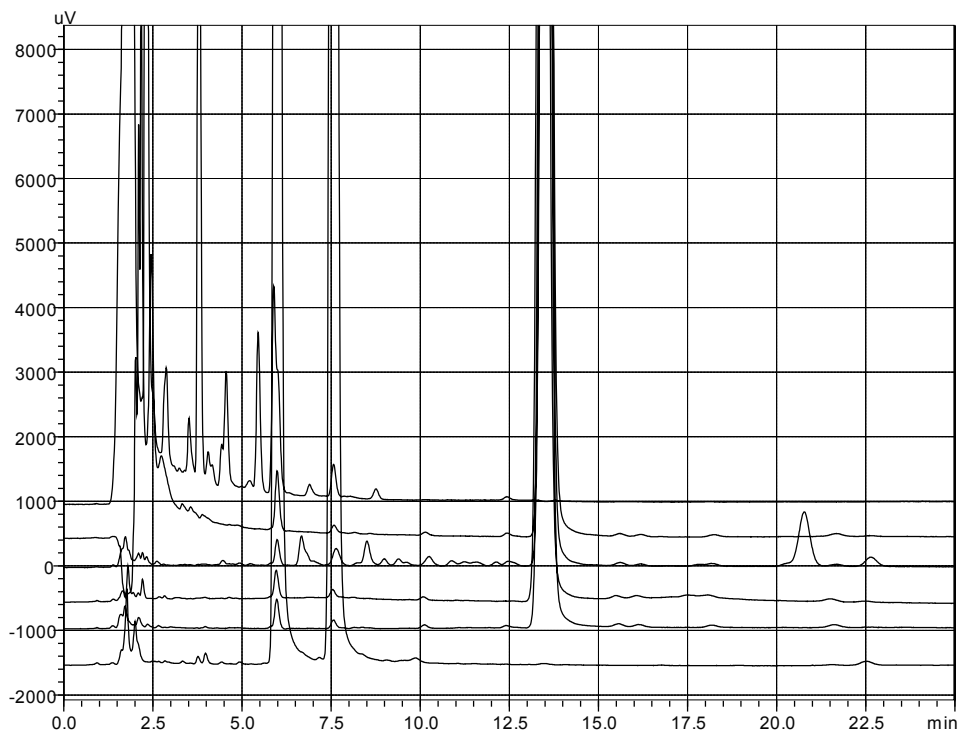
Используемые методики предложены для оценки препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» с указанием требований к пригодности хроматографической системы, а также сходимости результатов анализа.

Экспериментальная часть

Определение беклометазона дипропионата в препарате

Содержание беклометазона дипропионата в пробе определяют при проведении испытаний «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность доставляемой дозы» и «Количественное опреде-

Рисунок 1



Хроматограммы, полученные при проведении испытания «Количественное определение. Беклометазона дипропионат»

сверху вниз:

- «стрессовый раствор», полученный путем щелочного гидролиза;
- «стрессовый раствор», полученный путем кислотного гидролиза;
- «стрессовый раствор», полученный путем облучения УФ-светом;
- раствор стандартного образца беклометазона дипропионата;
- раствор препарата;
- раствор стандартных образцов беклометазона 17-пропионата и беклометазона 21-пропионата.

ление» [18]. Кроме того, проводят идентификацию беклометазона дипропионата в препарате методом ВЭЖХ при его количественном определении по совпадению времен удерживания основного пика на хроматограммах испытуемого раствора препарата с пиком СО беклометазона дипропионата на хроматограммах раствора сравнения. Для аналитических методик, используемых для количественного определения, следует продемонстрировать такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, прецизионность, линейность и диапазон применения, а для методики идентификации — специфичность [13, 17].

Валидацию методик идентификации и количественного определения беклометазона дипропионата методом ВЭЖХ проводили в соответствии с установленными требованиями [13, 17] на модельных образцах, полученных в лабораторных условиях из компонентов препарата, соответствующих требованиям нормативных документов для входного контроля качества [9, 15].

Специфичность. Хроматограммы, подтверждающие специфичность, представлены на Рис. 1.

Специфичность методики подтверждается тем, что:

- время удерживания пика беклометазона дипропионата на хроматограммах испытуемого раствора совпадает со временем удерживания соответствующего пика на хроматограммах раствора стандартного образца беклометазона дипропионата с точностью до 0.1 %;

- выбранные условия хроматографирования позволяют разделить пики беклометазона 17-пропионата, беклометазона 21-пропионата (коэффициент разделения 2.5) и беклометазона дипропионата и отделить их от системного пика;

- компоненты плацебо и возможно образующиеся примеси на хроматограммах «стрессовых» растворов препарата не мешают определению количественного содержания беклометазона дипропионата.

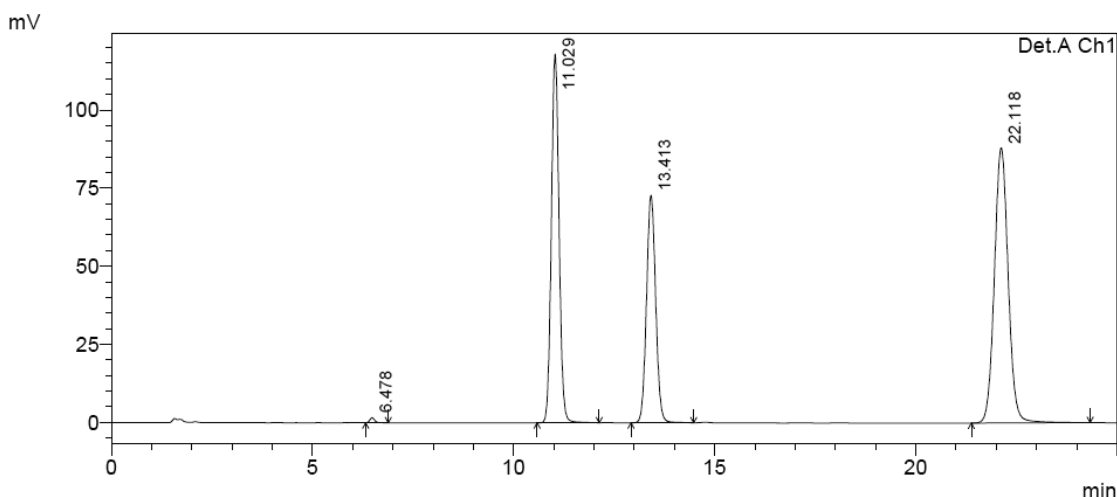
Дополнительно была продемонстрирована разделительная способность хроматографической системы при использовании в качестве внутреннего стандарта и вещества для проверки разделительной способности хроматографической системы тестостерона пропионата, а также по отношению к бетаметазона дипропионату, как структурному аналогу беклометазона дипропионата. Полученная хроматограмма представлена на Рис. 2.

В предложенных условиях хорошо разделяются пики бетаметазона дипропионата и беклометазона дипропионата (коэффициент разделения 6.15), и беклометазона дипропионата и тестостерона пропионата (коэффициент разделения 16.71).

Правильность, прецизионность (сходимость), линейность и диапазон применения

Количественное определение беклометазона дипропионата проводят при проведении тестов: «Доза мелкодисперсных частиц», где пре-

Рисунок 2



Хроматограмма раствора смеси бетаметазона дипропионата, беклометазона дипропионата и тестостерона пропионата

- пик со временем удерживания 11.029 мин соответствует бетаметазона дипропионату,
- пик со временем удерживания 13.413 мин соответствует беклометазона дипропионату,
- пик со временем удерживания 22.118 мин соответствует тестостерона пропионату.

дел содержания беклометазона дипропионата определяется: 35 % от номинального содержания для препарата с дозировкой 50 мкг/доза и 100 мкг/доза; 25 % от номинального содержания для препарата с дозировкой 250 мкг/доза; «Однородность доставляемой дозы», где пределы содержания беклометазона дипропионата составляют от 75 % до 125 % от среднего содержания в 10 дозах и «Количественное определение», где пределы содержания беклометазона дипропионата составляют от 80 % до 120 % от номинального содержания. Таким образом, характеристики правильности и прецизионности исследовались на модельных растворах препарата с концентрациями беклометазона дипропионата, которые находятся в пределах от 15 % до 140 % содержания по отношению к номинальному значению, что соответствует диапазону применения данной методики.

Приготовление модельных смесей:

31.25 мг беклометазона дипропионата помещают во взвешенную мерную колбу вместимостью 100 мл растворяют в 70 мл смеси растворителей *ацетонитрил Р - вода Р* (60:40), доводят объем раствора этим же растворителем до метки, снова взвешивают и перемешивают (312.5 мкг/мл беклометазона дипропионата) (исходный раствор).

Во взвешенные мерные колбы вместимостью 25 мл (класс А) помещают аликвоту исходного

раствора (от 0.3 мл до 2.8 мл) снова взвешивают, прибавляют по 50 мкл этанола (96 %) в качестве плацебо, доводят объем раствора смесью растворителей *ацетонитрил Р - вода Р* (60:40) до метки, снова взвешивают и перемешивают (от 3.75 мкг/мл до 35.00 мкг/мл). Далее проводят количественное определение в соответствии с установленной фармакопейной методикой [10].

Результаты расчетов метрологических характеристик методики при измерении концентраций беклометазона дипропионата приведены в Табл. 1.

(Примечание. Масса СО беклометазона дипропионата $m = 31.25$ мг. Концентрация раствора сравнения $c = 25$ мкг/мл).

Из данных, приведенных в Табл. 1, следует, что для беклометазона дипропионата методика анализа характеризуется достаточной правильностью и прецизионностью во всем диапазоне концентраций (от 15 % до 140 %) и является корректной. Как свидетельствуют данные Табл. 1, в диапазоне концентраций беклометазона дипропионата от 15 % до 140 % по отношению к номинальной концентрации методика не имеет значимой систематической погрешности.

Линейность методики также исследовали в диапазоне концентраций беклометазона дипропионата от 15 % до 140 % по отношению к номинальному значению. Установлено, что требования к параметрам линейной зависимо-

Таблица 1

Результаты анализа модельных смесей препарата, содержащих от 15 % до 140 % беклометазона дипропионата, и их статистическая обработка

№ раствора	Введено в % от концентрации раствора сравнения (X_i , факт. %)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y_i %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$
1	15.45	15.76	102.01
2	29.92	29.69	99.23
3	49.07	49.27	100.41
4	60.58	60.80	100.36
5	76.33	76.65	100.42
6	91.95	91.93	99.98
7	105.70	106.36	100.62
8	121.74	122.54	100.66
9	140.72	140.91	100.14
среднее, $Z_{ср}$ % =			100.42
относительное стандартное отклонение, s_z % =			0.73
относительный доверительный интервал Δ , % = $t(95\%, 8) \times s_z = 2.3060 \times s_z =$			1.7
критическое значение для сходимости результатов, $\max \Delta_{кр}$ % =			6.4
систематическая погрешность, $\delta = Z_{ср} - 100 =$			0.42
критерий незначимости систематической погрешности			
1) $\delta \leq \Delta / 3 = 1.7 / 3 = 0.57$			выполняется
2) если не выполняется 1), то $\delta \leq 2.0$			выполняется
общий вывод о методике			корректна

сти выполняются, то есть линейность методики определения беклометазона дипропионата подтверждается в диапазоне концентраций от 15 % до 140 % 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:

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

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 быть незначимым в сравнении с максимально допустимой неопределенностью [13, 17]:

$$|a| \leq \frac{0.32 \times \Delta_{As} (\%) }{1 - (20/100)} = \frac{0.32 \times 6.4}{0.8} = 2.6$$

$$|a| \leq 2.6$$

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 $f = 9 - 2 = 7$):

$$RSD_0 / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, 7)} = \frac{6.4}{1.895} = 3.4 \%,$$

где:

b — угол наклона для рассчитанной регрессионной прямой.

Требования к коэффициенту корреляции (r).

Концентрации, которые исследуются, характеризуются стандартным отклонением $RSD_Y = 54.77 \%$ (Табл. 2), которое рассчитывают по формуле:

$$RSD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_{i0} - C)^2}{(g-1)}} \times 100\%,$$

где:

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

C_{cp} — средняя концентрация растворов;

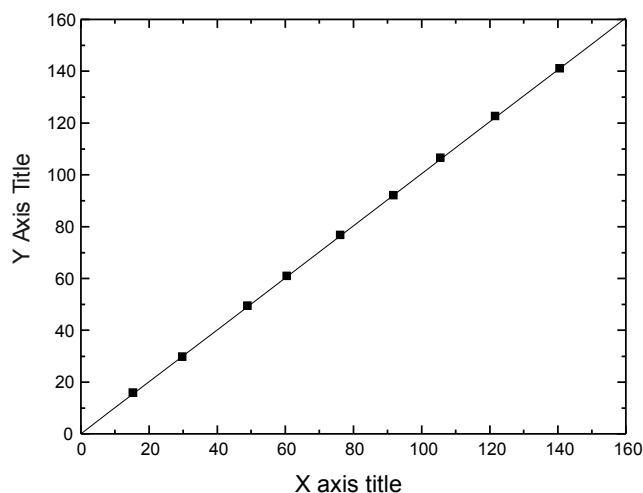
g — число выборок (число точек прямой).

Требования к коэффициенту корреляции рассчитывают по формуле:

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

$$\sqrt{1 - \left(\frac{RSD_0}{RSD_Y}\right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{3.38}{54.77}\right)^2} = 0.99809$$

Рисунок 3



Линейная зависимость площади пика от количества беклометазона дипропионата в нормализованных координатах

$$r \geq 0.99809$$

Результаты изучения линейности приведены на Рис. 3 и в Табл. 2.

Данные Табл. 2, подтверждают, что требования к линейности для методики количественного определения беклометазона дипропионата 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 неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) [13, 17]:

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

Вначале оценим неопределенность пробоподготовки.

Неопределенность навески СО беклометазона дипропионата $0.2/31.25 \times 100 = 0.64\%$.

Неопределенность объема мерной колбы 50 мл — 0.17% .

Неопределенность объема пипетки 1 мл — 0.6% .

Неопределенность объема мерной колбы 25 мл — 0.23% .

Неопределенность объема мерной колбы 50 мл — 0.17% .

Суммарная неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) равна [13, 17]:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.64^2 + 0.17^2 + 0.6^2 + 0.23^2 + 0.17^2} = 0.94$$

Неопределенность конечной аналитической операции (хроматографирования) (Δ_{As}) рассчитывают, исходя из требований к максимальному относительному стандартному отклонению площадей пиков беклометазона дипропионата 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% [13, 17]:

$$\Delta_{FAO} = \frac{\sqrt{2} \times 1.65 \times RSD_{max}}{\sqrt{n}} = 0.82 \times 1.65 \times 2.68 = 3.62,$$

где:

1.65 — коэффициент Гаусса для односторонней вероятности 95% .

В итоге, полная неопределенность методики анализа равна:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.94^2 + 3.62^2} = 3.74$$

При допустимом 20% отклонении концентрации беклометазона дипропионата в препарате рассчитанное значение суммарной неопределенности не превышает значения $max \Delta_{As} = 0.32 \times 20 = 6.4 > 3.74$. Это свидетельствует о том, что методика соответствует критериям 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 опытных серий препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» в течение 2 лет и 3 мес (по 3 серии для каждого препарата).

Посторонние примеси

В препаратах беклометазона дипропионата, согласно методике, включенной в фармакопейную монографию, контролируют содержание неспецифических примесей методом тонкослойной хроматографии [10]. Нами предложено проводить определение содержания посторонних примесей одновременно с тестом «Количественное определение. Беклометазона дипропионат» методом ВЭЖХ, что сокращает

Таблица 2

Метрологические характеристики линейной зависимости площади пика от количества беклометазона дипропионата

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Заключение
b	1.00348			
S_b	0.00249			
a	0.00483	$\leq 1.895 \times S_a = 4.0 $	$\leq 2.6 $	выдерживается по 1 критерию
S_a	0.21507			
RSD_0	0.29602			
RSD_0/b	0.29	$\leq 3.38 $		выполняются
r	0.99998	$> 0.99809 $		выполняются

общее время анализа. Метод ВЭЖХ используется для анализа субстанции беклометазона дипропионата по разделу «Сопутствующие примеси» [9].

Согласно установленным требованиям [13, 17], при валидации методики контроля предельного содержания примесей проверяется *специфичность и предел обнаружения* (ПО).

Для проверки пригодности хроматографической системы использовался контроль разделительной способности системы по отношению к беклометазона 17-пропионату и беклометазона 21-пропионату (Рис. 4) — наиболее вероятным продуктам деструкции беклометазона дипропионата [9] (коэффициент разделения 9.65). Предельное содержание примесей определяют путем сравнения с разведенным испытуемым раствором с содержанием беклометазона дипропионата 2 % от номинального значения.

При этом допускается наличие пиков, за исключением основного пика беклометазона дипропионата и системного пика, площадь которых не превышает площади пика, полученного на хроматограммах раствора сравнения (2 %); допускается наличие не более одного пика, площадь которого превышает половину площади пика, полученного на хроматограммах раствора сравнения (1.0 %); сумма площадей всех пиков, за исключением основного пика беклометазона дипропионата и системного пика, на хроматограммах испытуемого раствора не должна превышать площади пика, полученного на хроматограмме раствора сравнения, более чем в 1.25 раза (2.5 %).

Проверку специфичности методики проводили одновременно с тестом «Количественное определение» (см. выше).

Предел обнаружения

При нормировании содержания примесей оценивается суммарное содержание примесей путем сравнения суммы площадей дополнительных пиков и площади пика беклометазона дипропионата. Соответственно, предел обнаружения (ПО) рассчитывается для беклометазона дипропионата; при этом существуют три подхода:

1. По определению предела обнаружения (ПО): $ПО \leq \max ПО = 0.32 \text{ mL}$.

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

Величина шума оценивается по амплитуде, то есть 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:

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

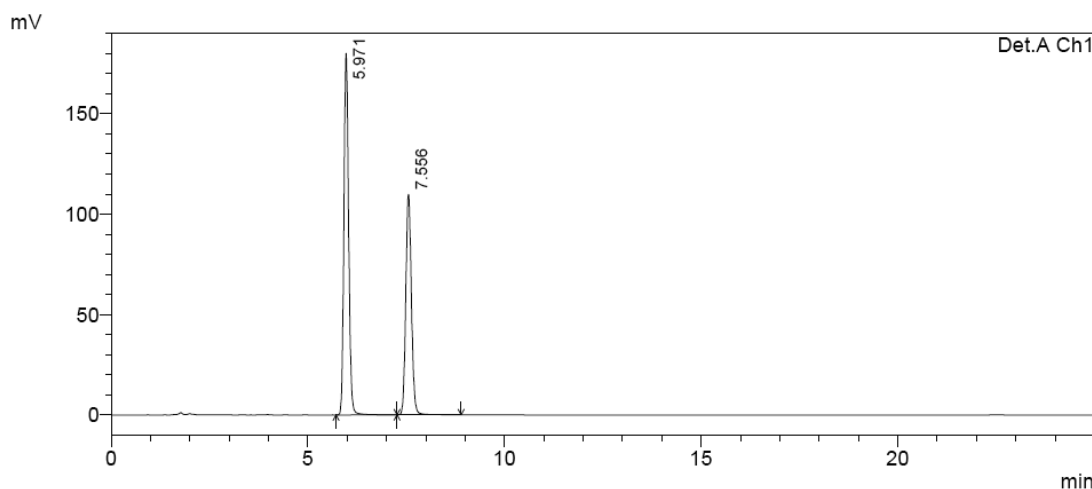
Методика оценена по указанным критериям и получены следующие результаты:

1. $ПО = 3.3 \times s_a = 3.3 \times 0.21507 = 0.7$

В нашем случае оценивается содержание любой примеси менее 1 %, что выше предела обнаружения (0.7 %).

2. В условиях проведения теста величина аналитического сигнала (высота пика) для раствора сравнения составляет около 1.5 mV, значение амплитуды шумовых волн около 0.1 mV. Получаем: $3 \times S/N = 1.5 / 0.1 = 15 \geq 3.2$.

Рисунок 4



Хроматограмма, полученная при проведении теста «Пригодность хроматографической системы»

- пик со временем удерживания 7.183 мин соответствует беклометазона 17-пропионату,
- пик со временем удерживания 10.536 мин соответствует беклометазона 21-пропионату.

3. Используя данные, полученные при исследовании линейности методики в диапазоне содержания беклометазона дипропионата от 15 % до 140 % от номинального значения, получаем: $3.3 \times \delta/b = 3.3 \times 0.21507/1.00348 = 0.7 \leq 3.2$.

Выводы

1. Для анализа препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза» использована фармакопейная методика количественного определения беклометазона дипропионата методом ВЭЖХ и проведена ее валидация по характеристикам специфичность, правильность, прецизионность, линейность и диапазон применения. На основании расчета полной неопределенности показано, что методика разработана в соответствии с критериями пригодности для количественного определения беклометазона дипропионата в лекарственном препарате и будет давать корректные результаты в других лабораториях.

2. Методика количественного определения беклометазона дипропионата валидирована в диапазоне, применимом для проведения тестов «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность доставляемой дозы» и «Количественное определение. Беклометазона дипропионат» для препарата «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза».

3. Предложена методика определения примесей методом ВЭЖХ в препарате «Беклометазон, ингаляция под давлением, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза и 250 мкг/доза», используемая для анализа субстанции беклометазона дипропионата по разделу «Сопутствующие примеси», и представлены такие ее валидационные характеристики как специфичность и предел обнаружения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фещенко Ю.И. Бронхиальная астма — одна из главных проблем современной медицины // Укр. пульмонолог. журн. — 2000. — № 2. — С. 13-15.
2. Фещенко Ю.И., Дзюблик А.Я., Мухин А.А. Эффективность Беклазона и Саламола в лечении больных бронхиальной астмой // Український медичний часопис. — 2000. — № 3 (17). — С. 5-8.
3. Barnes P.J. Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma // J. Allergy Clin. Immunol. — 1998. — Vol. 102. — P. 531-538.
4. Barnes P.J., Pedersen S. Efficacy and Safety of inhaled corticosteroids in asthma // Amer. Rev. respire. Dis. — 1993. — Vol. 148. — P. 1-26.
5. Белоусов Ю.Б., Омеляновский В.В. Клиническая фармакология болезней органов дыхания. — М.: Универсум Паблишинг, 1996. — 176 с.
6. Essential Drug List. — 2007. — www.WHO. Ind.
7. Preparations for Inhalation // European Pharmacopoeia. — 6 ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. — P. 739-743.
8. 2.9.18. Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles // European Pharmacopoeia. — 6 ed. — Stras-

bourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. — P. 287-300.

9. Beclometasone dipropionate // European Pharmacopoeia. — 6 ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. — P. 1254-1259.

10. Beclometasone dipropionate Pressurised Inhalation // British Pharmacopoeia. — Vol. II. — London: HMSO, 2007. — CD-edition, Version 11.0.

11. <1010> Analytical Data — Interpretation and Treatment // USP Pharmacopoeia. — 30 ed. - CD-edition.

12. General Information Chapter 1226 «Verification of Compensial Procedures» // Pharm. Forum. — 2005. — Vol. 31, № 2. — P. 555-558.

13. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Багирова В.Л., Гризодуб А.И., Чибилев Т.Х. и др. — М., 2007. — 48 с.

14. КОМПЕНДИУМ 2008 — лекарственные препараты: В 2 т. / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — К.: «МОРИОН», 2008. - Т. 1. — С. А-158.

15. Етанол (96 %) // Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 1. — Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2004. — С. 339-343.

16. 2.2.46. Методи хроматографічного розділення // Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 78-84.

17. 2.2.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 85-100.

18. Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products. — London, 2005. — 25 p.

19. Лікарські засоби для інгаляції // Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 298-303.

20. 2.9.18. Лікарські засоби для інгаляції: аеродинамічне визначення дрібнодисперсних часток // Державна Фармакопея України / Державне Підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне Підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 150-164

Резюме

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

Валідація методик аналізу препарату «Беклометазон інгаляція під тиском»

Для аналізу препарату «Беклометазон, інгаляція під тиском, 50 мкг/доза, 100 мкг/доза та 250 мкг/доза» використано фармакопейну методику кількісного визначення беклометазону дипропионату методом ВЕРХ і проведено її валидацію за характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування. Методику кількісного визначення беклометазону дипропионату валидовано у діапазоні застосування від 15 % до 140 %, що відповідає концентраціям при випробуваннях «Доза дрібнодисперсних часток», «Однорідність дози, що доставляється» і «Кількісне визначення. Беклометазону дипропионат». На підставі розрахунку повної невизначеності показано, що методика відповідає критеріям придатності для кількісного визначення беклометазону дипропионату у препаратах і даватиме коректні результати в інших лабораторіях. Наведено відповідність препарату фармакопейним вимогам. Для визначення неспецифічних домішок методом ВЕРХ для препарату використано фармакопейну методику та проведено її валидацію за характеристиками специфічність і межа виявлення.

Summary

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

**Validation of methods of analysis of preparation
«Beclometasone, pressurised inhalation»**

For an analysis of the preparation «Beclometasone, pressurised inhalation, 50 mkg/dose, 100 mkg/dose and 250 mkg/dose» was used pharmacopoeial method of an assay of beclometasone dipropionate by HPLC, and was given its validation at such characteristics as specificity, accuracy, precision, linearity, range of the use. Method of an assay of beclometasone dipropionate was validated at the range from 15 % to 140 %, what also included concentrations, which have been used at tests «Dose of fine particles», «Uniformity of dose» and «Assay of Beclometasone dipropionate». At the basis of the calculation of total uncertainty was shown that the method conformed to criterion of suitability for the assay of beclometasone dipropionate in drugs and will give correct data in other laboratories. It was shown compliance of developed drug to pharmacopoeial requirements. At the determination of nonspecific impurities by HPLC for the drug was adapted and used appropriate pharmacopoeial method and conducted its validation according such indices as specificity and detection limit.

Бовтенко Владимир Александрович (р. 1970). Окончил Харьковский государственный университет (1994). Мл. науч. сотр. лаборатории аналитической химии ГП ГНЦЛС (с 1994).

Безуглая Елена Петровна. Ст. науч. сотр. лаборатории жидких и мягких лекарственных средств 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 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 ГНЦЛС (с 1997). К.фарм.н. (2008).

УДК 543.544:544.77

Георгиевский Г.В., Куликов А.Ю.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

**Определение примесей в отечественных субстанциях – производных
1,2,4-триазола – методом обращенно-фазовой ВЭЖХ**

Разработаны методики определения примесей в биологически активных субстанциях - производных 1,2,4-триазола (тиотриазолине и кардиотриле) - методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. На основании предложенных методик изучена стабильность субстанций в различных стрессовых условиях (облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (УФ-облучение светом ртутной лампы; кислотный гидролиз 0.1 М раствором кислоты хлористоводородной; окислительное разложение 3 % раствором водорода пероксида). Сделаны выводы о стабильности субстанций, условиях их хранения и селективности метода определения примесей.

Органические соединения — производные 1,2,4-триазола обладают широким спектром биологического действия и используется в качестве лекарственных средств [1]. В настоящее время как лекарственные средства применяют:

- активный химиотерапевтик - 4-(5-нитрофурилилиденамино)-ан-1,2,4-триазол (фуракрилин);
- аналептик - 3-этил-4-циклогексил-1,2,4-триазол (азоман);
- коронаролитик - 7-н-диэтил-5-метил-1,2,4-триазоло-(1,5-α) пиридин (рокорнал);
- цитостатик — 5-О-3,5-диамино-1,2,4-триазол (гуанозол);
- антидепрессант — 2-[3(α-м-хлорфенил-1-пиперазинил)]-пропил-1,2,4-триазол-(4,3 α) пиридин-3(2н)-он (триазодона гидрохлорид).

Производные 1,2,4-триазола эффективны как анксиолитические, антигистаминные, кардиотропные, бронхолитические, спазмолитические, антигипоксические, антимикотические,

противозачаточные, антилейшманиозные средства, а также как антагонисты холицистокинина и ингибиторы ароматозы.

Одними из таких соединений является тиотриазолин — морфолиниевая соль 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты, и кардиотрил — 1-(β-фенилэтил)-4-амино-(п-диметиламинобензальдегид)-1,2,4-триазолия бромид, синтезированные коллективом автором под руководством проф. Мазура И.А. [2].

Тиотриазолин проявляет антиоксидантные, противовирусные, противовоспалительные свойства, а также стимулирует процессы регенерации в миокарде, печени и других органах.

Кардиотрил проявляет противоишемическое, вазодилаторное, мембранностабилизирующее и фибринолитическое действия.

Целью данной работы является разработка и валидация методик определения примесей в лекарственных субстанциях — производных 1,2,4-триазола — кардиотриле и тиотриазолине.

Материалы и методы

Использованные в работе тиотриазолин 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион, 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота; кардиотрил; 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид были представлены разработчиками лекарственных субстанций (группа проф. Мазура И.А.); п-диметиламинобензальдегид производства фирмы «Fluka Chemie» (Buchs, Швейцария).

Структурные формулы изучаемых соединений представлены на Рис. 1.

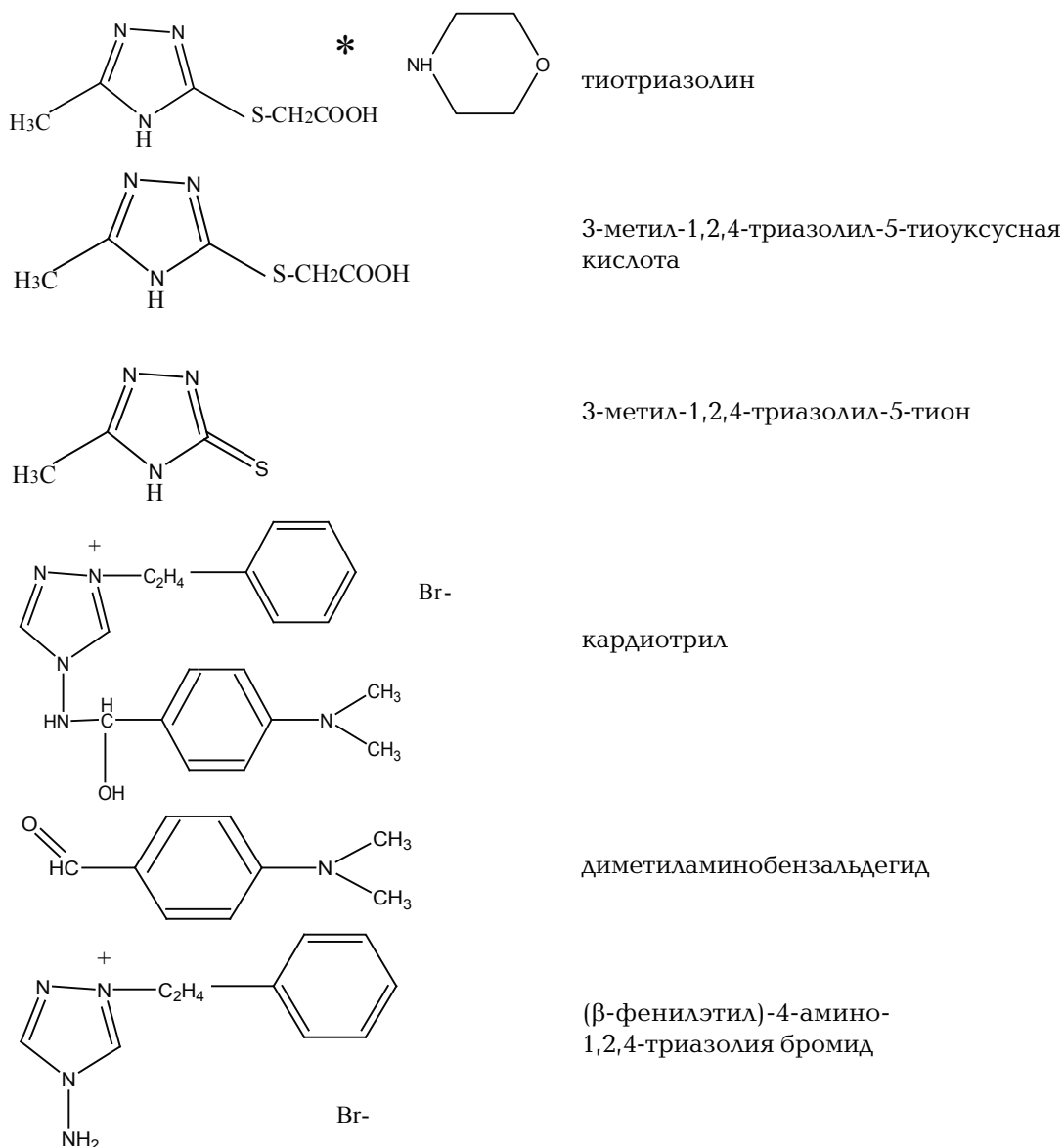
Для приготовления подвижных фаз использовали лития дигидрофосфат, кислоту фосфорную концентрированную, ацетонитрил для

хроматографии фирмы «Fluka Chemie» (Buchs, Швейцария).

Хроматографирование проведено на жидкостном хроматографе Hewlett Packard 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), снабженном интегратором серии 3395. Хроматографические колонки: Kromasil C18 (250 мм×4.6 мм, 5 мкм) и Resolve C18 (300 мм×4.6 мм, 5 мкм), производства фирмы «Waters», США. Разделение проводили при температуре (30.0±0.1) °С, скорость подвижной фазы - 1.0 мл/мин, объем вводимой пробы - 10 мкл.

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

Рисунок 1



Структурные формулы изучаемых соединений

Результаты исследований и их обсуждение

Селективность (специфичность) – основной валидационный показатель, который проверяется при разработке методик определения примесей в лекарственных субстанциях, согласно руководствам ИСН по валидации методик ВЭЖХ [3-6].

Селективность – способность методики измерять отклик аналита в присутствии его потенциальных примесей. Разложение субстанции в стрессовых условиях может помочь выявить потенциальные примеси, которые могут появиться в процессе хранения субстанции, показать стабильность молекулы изучаемого вещества и провести валидацию стабильности субстанции при разработке аналитической методики.

Стрессовое разложение субстанции проводят с использованием различных методов ее разложения:

- 1) облучение светом, чаще всего ультрафиолетовым (согласно требованиям руководства ИСН Q1В);
- 2) кислотный гидролиз (0.1 М раствор HCl);
- 3) щелочной гидролиз (0.1 М раствор NaOH);
- 4) гидролиз водных растворов и/или окислительное разложение (3 % раствор H₂O₂).

Разложение нагреванием или воздействием солнечного света проводят в течение 10 сут, в то время как для гидролиза и окислительных процессов необходима температура около 100 °С и время от 0.5 ч до 4 ч [3, 4, 7].

При исследовании стабильности субстанции нами были использованы следующие пути получения возможных продуктов разложения:

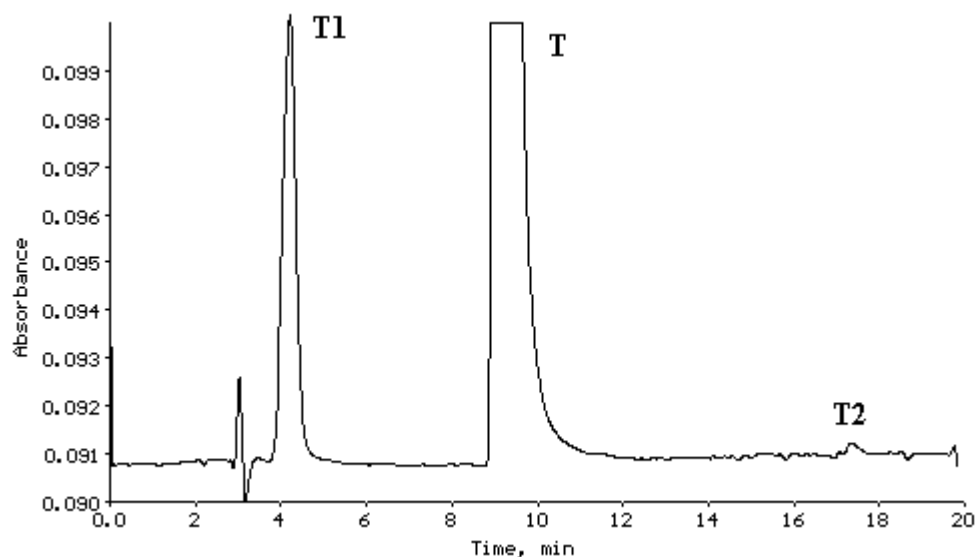
- 1) облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (УФ-облучение светом ртутной лампы);
- 2) кислотный гидролиз 0.1 М раствором кислоты хлористоводородной;
- 3) окислительное разложение 3 % раствором водорода пероксида.

Для этого был приготовлен раствор испытуемой субстанции в смеси ацетонитрил - вода (1:1) с концентрацией 1 мкг/мл. Полученный раствор хроматографировали и использовали как раствор сравнения.

10.0 мл раствора испытуемой субстанции помещали в кварцевую чашку, которую затем помещали на расстоянии 20 см от источника излучения (ртутная лампа) и выдерживали под воздействием УФ-света в течение 1.5 ч. После облучения раствор количественно, при помощи смеси ацетонитрил - вода (1:1), переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали.

10.0 мл раствора испытуемой субстанции помещали в сосуд вместимостью 20 мл, прибавляли 1.0 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и выдерживали при температуре (70±5) °С в течение 3 ч. После гидролиза раствор количественно, при помощи смеси ацетонитрил-вода (1:1), переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью

Рисунок 2



Разделение тиотриазолина (Т) с 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тионом (Т1)

растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали.

10.0 мл раствора испытуемой субстанции помещали в сосуд вместимостью 20 мл, прибавляли 1.0 мл 30 % раствора водорода пероксида и выдерживали при температуре (70 ± 5) °С в течение 3 ч. После окислительного разложения раствор количественно, при помощи смеси ацетонитрил - вода (1:1), переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали.

После хроматографирования оценивали полученные хроматограммы и делали вывод о стабильности субстанции и селективности методики определения примесей.

Тиотриазолин (морфолиниевая соль 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты)

Выбор условий хроматографирования. Для выбора условий хроматографирования были использованы расчетные данные о величинах коэффициента распределения октанол - вода ($\log P_{o/w}$, гидрофобность вещества), константах протонизации, а также литературные данные [8], в которых отмечается, что при хроматографировании азотсодержащих соединений чаще всего используют кислые подвижные фазы.

При помощи программы ACD Labs (ACD/Labs 10 [9]) были рассчитаны величины гидрофобности, которые для тиотриазолина (3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты) составили $\log P = 0.45$, $c\log P = -0.842$, соответственно. Исходя из полученных величин можно сделать вывод, что тиотриазолин должен удерживаться

на обращенно-фазовых сорбентах типа C18 с использованием кислых подвижных фаз с низким (до 10 %) содержанием органического модификатора. Кроме того, наличие карбонильной группы приводит к выводу, что подвижная фаза должна быть кислой (рН менее 3).

Предварительный эксперимент показал, что приемлемое (около 10 мин) и воспроизводимое удерживание тиотриазолина можно добиться с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил — вода, доведенной до рН 2,0 кислотой фосфорной концентрированной в объемном соотношении 2:98.

В указанных условиях наблюдается хорошее разделение пиков тиотриазолина с одним из полупродуктов синтеза — 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тионом (Рис. 2).

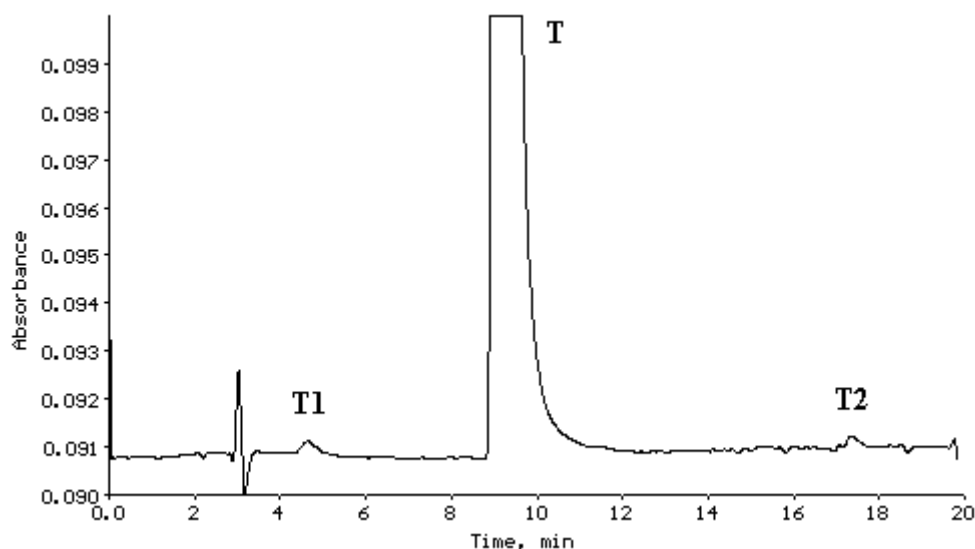
Как видно из Рис. 2, на хроматограмме наблюдается еще один пик примеси со временем удерживания около 18 мин (T2); возможно это тиотриазолин-димер.

На Рис. 3 приведена хроматограмма раствора тиотриазолина, который впоследствии будет подвергнут различным стрессовым разложениям.

Как видно из Рис. 3, на хроматограмме наблюдается наличие примеси 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона (около 0.2 %) и димера (около 0.2 %). Водно-ацетонитрильный раствор тиотриазолина достаточно устойчив, и после 8 ч (хранился в защищенном от света месте) для данного раствора не наблюдалось увеличения содержания примесей.

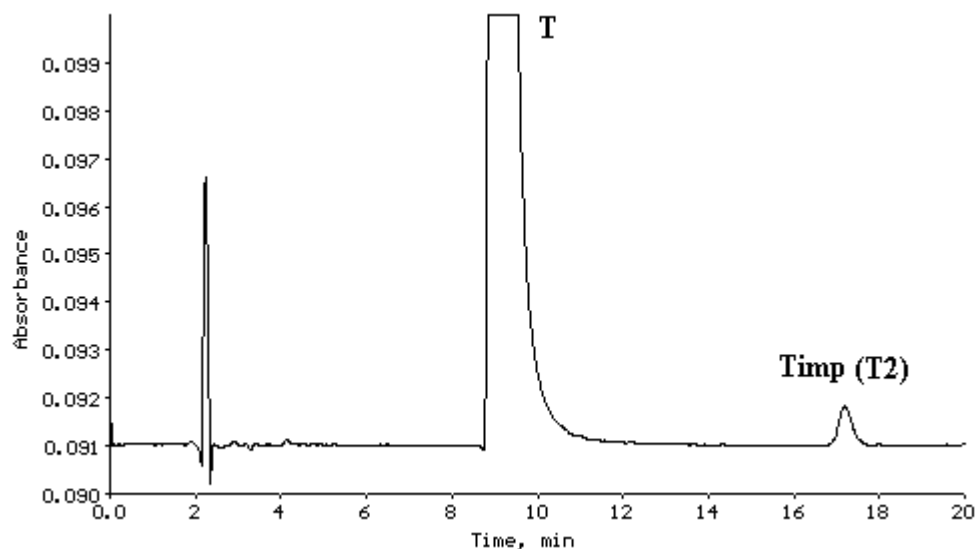
Кислотный гидролиз. На Рис. 4 приведена хроматограмма раствора, полученного при кислотном гидролизе тиотриазолина.

Рисунок 3



Хроматограмма раствора тиотриазолина

Рисунок 4



Хроматограмма раствора, полученного при кислотном гидролизе тиотриазолина

Как видно из Рис. 4, при кислотном гидролизе наблюдается значительное увеличение примеси (T_{imp}) со временем выхода около 18 мин, которая, как мы предположили, может быть димером тиотриазолина. Содержание примеси составляет 0.6 % (метод внутренней нормировки).

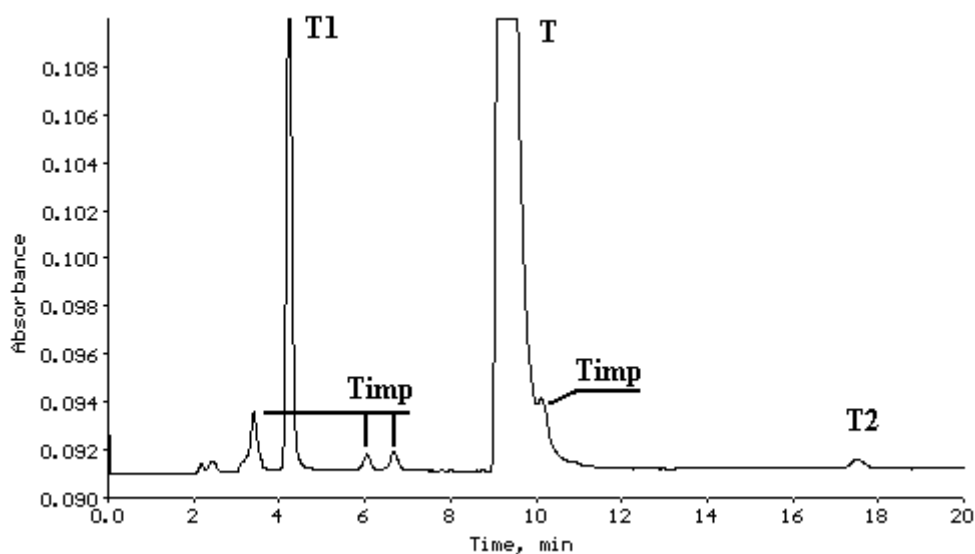
Разложение субстанции под действием УФ-света. На Рис. 5 приведена хроматограмма раствора, полученного при разложении тиотриазолина жестким ультрафиолетовым светом.

Как видно из Рис. 5, субстанция достаточно

чувствительна к воздействию света: наблюдается значительное увеличение содержания примеси 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона (около 7.8 %). Содержание примеси димера практически не изменяется (около 0.3 %), но при этом наблюдается образование еще ряда примесей, содержание которых составляет 1.4 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.4 %, соответственно (метод внутренней нормировки).

Следовательно, тиотриазолин чувствителен к воздействию света, и как субстанцию, так и лекарственную форму, необходимо хранить в

Рисунок 5



Хроматограмма раствора, полученного при стрессовом разложении тиотриазолина под действием жесткого УФ-излучения

Таблица 1

Условия стрессового разложения	Количественное содержание основного вещества тиотриазолина, %	Массовый баланс, % (содержание основного вещества, % + содержание продуктов деградации и примесей, %)
без разложения	99.6	99.9
облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (20 см, 1.5 ч)	89.4	99.5
кислотный гидролиз 0.1 М раствором HCl (70 °C; 3 ч)	99.4	99.9
окислительное разложение 3 % раствором H ₂ O ₂ (70 °C; 3 ч)	57.7	99.1

контейнере из темного стекла и в защищенном от света месте.

Окислительное разложение. На Рис. 6 приведена хроматограмма раствора, полученного при окислительном разложении субстанции тиотриазолина.

Как видно из Рис. 6, субстанция достаточно чувствительна к окислителям: наблюдается значительное увеличение содержания примеси 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиона (около 41.0 %). Содержание примеси димера практически не изменяется (около 0.2 %), но при этом наблюдается образование еще ряда примесей, содержание которых составляет от 0.1 % до 0.2 % (метод внутренней нормировки).

Следовательно, тиотриазолин чувствителен к окислителям, и лекарственная форма должна содержать в своем составе антиоксидант.

Исходя из приведенных хроматограмм, также можно сделать вывод, что полупродукты синтеза и примеси, которые могут образоваться при хранении (результаты стрессового разложения), могут быть отделены от основного

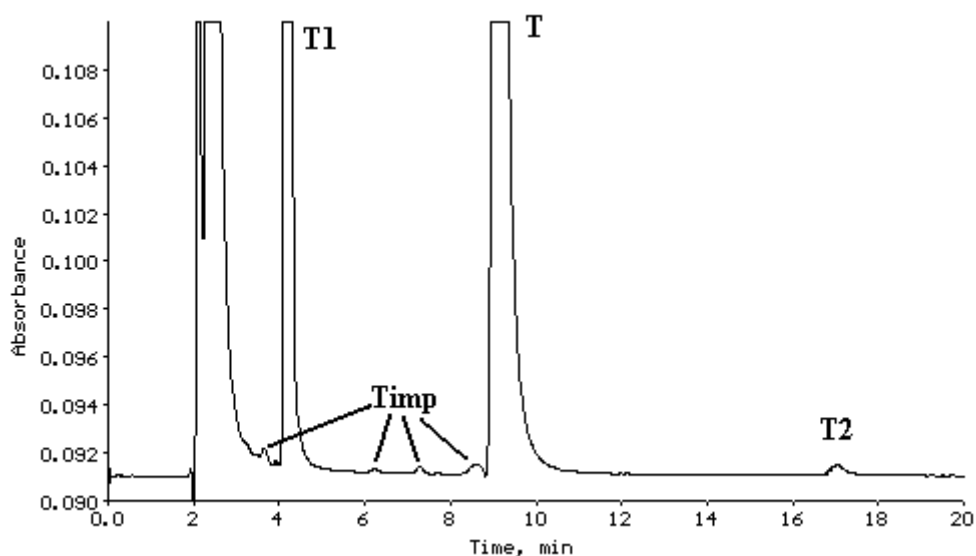
вещества — тиотриазолина, и количественно оценены (Табл. 1).

Методика определения содержания примесей в тиотриазолине

Приготовление испытуемого раствора. 0.025 г (точная навеска) тиотриазолина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в смеси ацетонитрил - вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

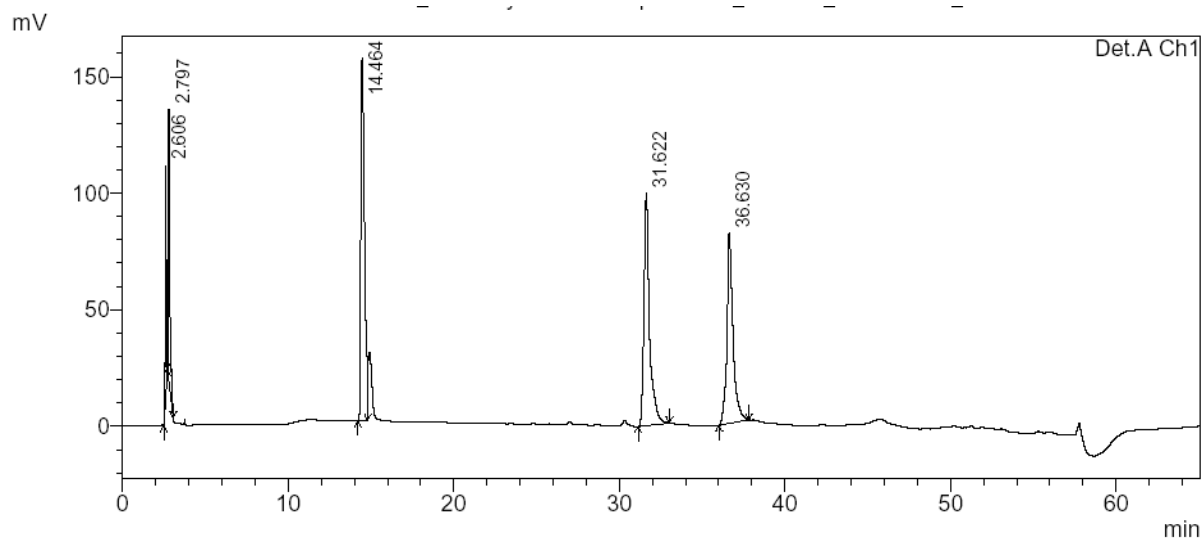
Раствор сравнения: 0.05 г (точная навеска) 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиона и 0.05 г (точная навеска) тиотриазолина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси ацетонитрил - вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил - вода (1:10) до метки и перемешивают (0.5 % примеси).

Рисунок 6



Хроматограмма раствора, полученного при окислительном разложении тиотриазолина

Рисунок 7



Разделения кардиотриала ($t_R=36.6$) с продуктами полуреакции 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолием бромидом ($t_R=14.5$) и п-диметиламинобензальдегидом ($t_R=31.6$) в режиме градиентного элюирования

По 20 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения и смеси ацетонитрил - вода (1:1) хроматографируют, получая не менее 3 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

- колонка Resolv C18, размером 300 мм × 4.6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм или аналогичная;
- подвижная фаза: смесь ацетонитрил – вода, доведенная до pH 2.0 кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически) (2:98), дегазированная любым удобным способом;

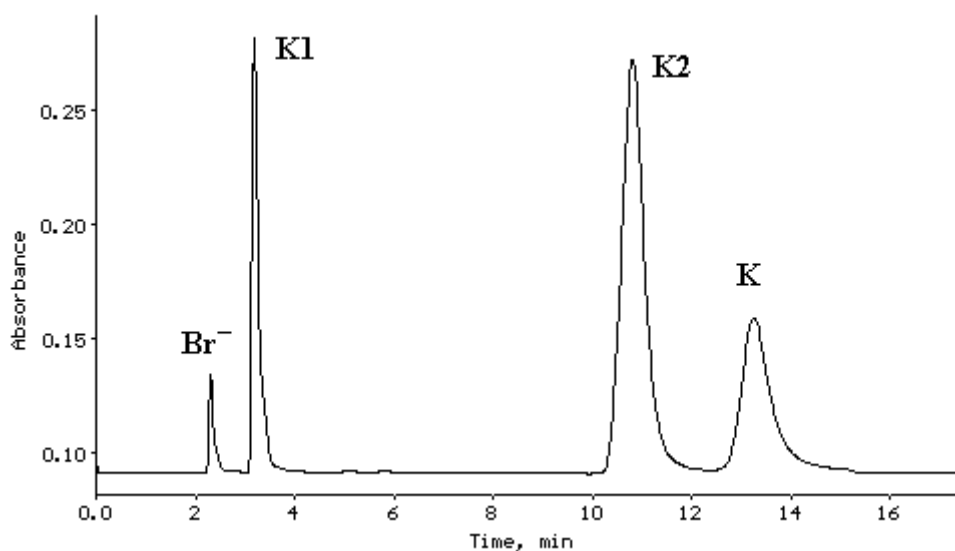
- скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин;
- температура колонки 30 °С;
- длина волны детектирования 220 нм.

Время хроматографирования должно быть в 3 раза больше времени удерживания основного пика.

На хроматограмме раствора сравнения порядок выхода пиков следующий: 3-метил-1,2,4-триазол-5-тион, тиотриазолин.

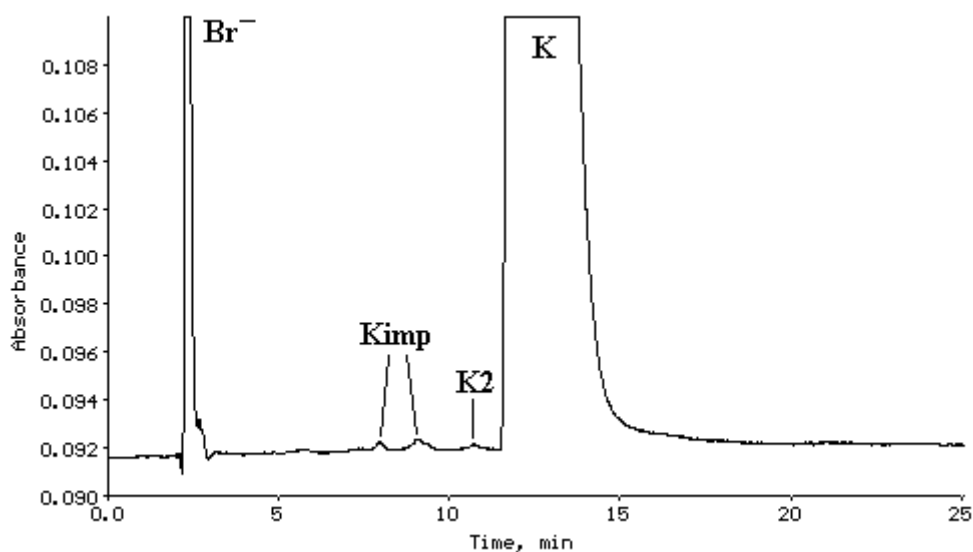
На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика 3-метил-1,2,4-триазол-5-тиона не должна превышать площади пика 3-метил-

Рисунок 8



Разделение кардиотриала (K) с полупродуктами реакции: 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолием бромидом (K1) и п-диметиламинобензальдегидом (K2) в изократическом режиме

Рисунок 9



Хроматограмма испытуемого раствора кардиотрила

1,2,4-триазол-5-тиона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.5 %).

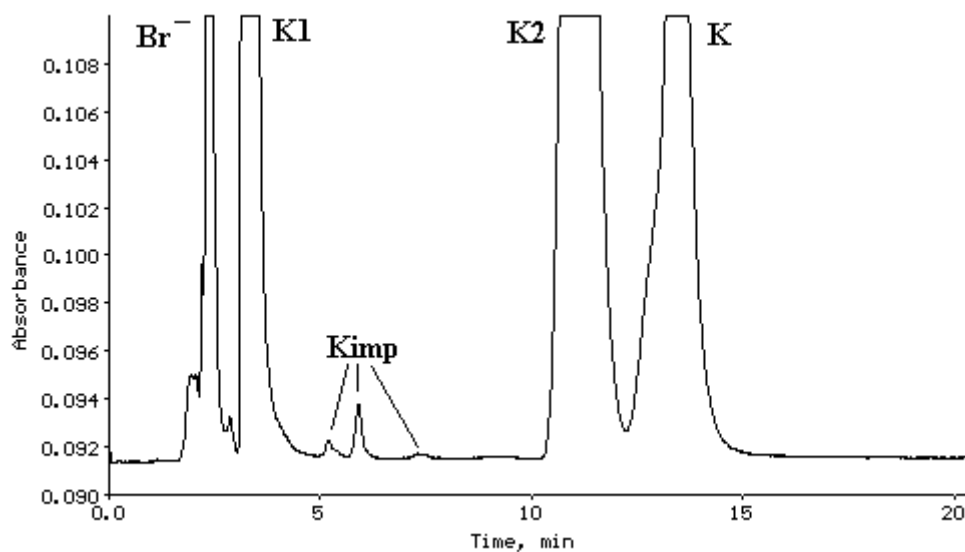
На хроматограмме испытуемого раствора площади дополнительных пиков, кроме пика 3-метил-1,2,4-триазол-5-тиона и пиков, времена удерживания которых совпадают со временами удерживания пиков на хроматограмме смеси ацетонитрил - вода (1:1), не должны превышать площади пика тиотриазолина на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.5 % каждой примеси). Суммарное содержание неидентифицированных примесей не должно превышать 1.0 %.

Кардиотрил (1-(β-фенилэтил)-4-амино-(p-гидрокси)бензальдегид)-1,2,4-триазиола бромид)

Выбор условий хроматографирования

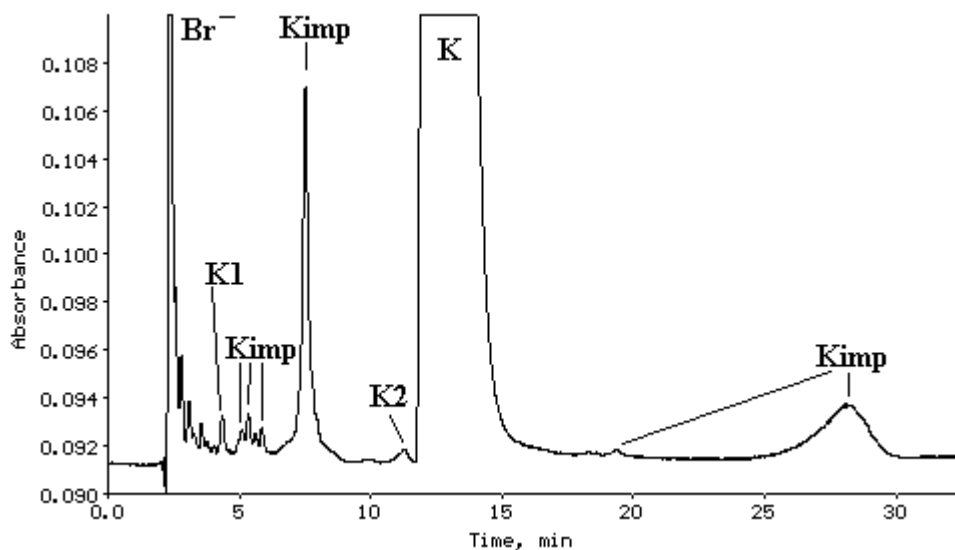
Использование программы ACD Labs для расчета параметров гидрофобности заряженных соединений затруднительно, так как общие (табличные) критерии расчета гидрофобности в этом случае применить нельзя. Упрощенный критерий гидрофобности Шатца [10] в данном случае также не применим, по той же самой причине. Следовательно, выбрать усло-

Рисунок 10



Хроматограмма раствора, полученного при кислотном гидролизе кардиотрила

Рисунок 11



Хроматограмма раствора, полученного при стрессовом разложении кардиотрила под действием жесткого УФ-излучения

вия хроматографирования можно только экспериментально.

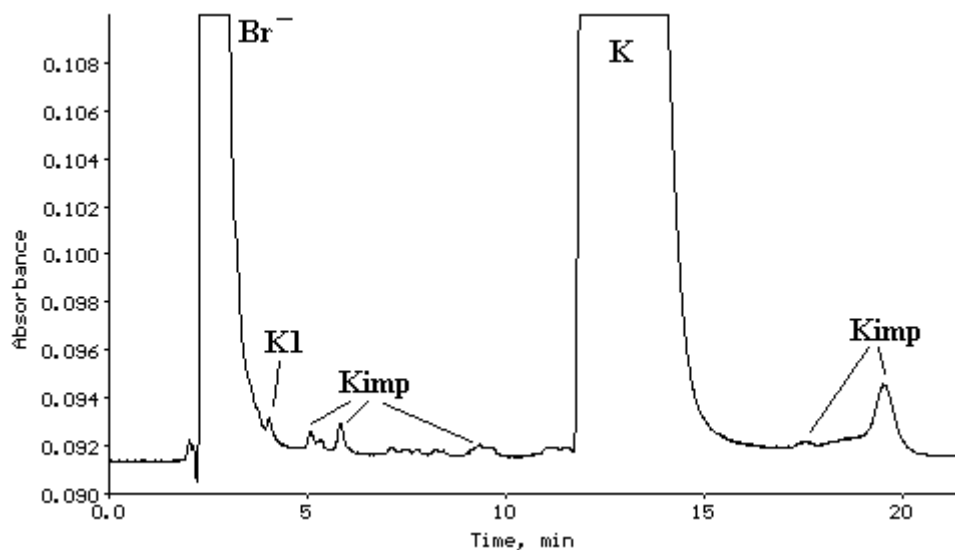
Азотистые основания чаще всего хроматографируют с использованием кислых подвижных фаз с добавками компонентов, которые препятствуют взаимодействиям с остаточными силанолами подвижной фазы.

В нашем случае для выбора условий хроматографирования использовали буферный раствор, содержащий лития фосфат, и градиентное элюирование проводили с использованием ацетонитрила (от 5 % до 70 %).

Хроматограмма, полученная в условиях градиентного элюирования, приведена на Рис. 7

Видно, что режим градиентного элюирования позволяет разделить кардиотрил и полупродукты его синтеза, однако время анализа в данном случае достаточно велико. Для уменьшения времени анализа нами был проведен эксперимент по выбору состава подвижной фазы в режиме изократического элюирования. При использовании подвижной фазы состава ацетонитрил — буферный раствор ((45-50) % об/об) нам удалось как разделить примеси, так и уменьшить время

Рисунок 12



Хроматограмма раствора, полученного при окислительном разложении кардиотрила

анализа. На Рис. 8 приведена хроматограмма, полученная в режиме изократического элюирования: наблюдается хорошее разделение пиков кардиотрила с полупродуктами синтеза — 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолием бромидом и п-диметиламинобензальдегидом.

На Рис. 9 приведена хроматограмма раствора кардиотрила, который впоследствии подвергнут различным стрессовым разложениям.

Как видно из Рис. 9, на хроматограмме наблюдается наличие незначительного количества примеси п-диметиламинобензальдегида (около 0.03 %) и двух неизвестных примесей (0.09 % и 0.05 %, соответственно). Водно-ацетонитрильный раствор кардиотрила достаточно устойчив, и после 6 ч (хранился в защищенном от света месте) для данного раствора не наблюдалось увеличения содержания примесей. Расчеты велись без учета пика бромид-иона.

Кислотный гидролиз. На Рис. 10 приведена хроматограмма раствора, полученного при кислотном гидролизе кардиотрила.

Как видно из Рис. 10, при кислотном гидролизе наблюдается значительное разложение кардиотрила с образованием 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (K1) и п-диметиламинобензальдегида (K2). Кроме того, на хроматограмме можно отметить наличие еще нескольких неизвестных примесей, содержание которых составляет от 0.1 % до 0.2 % (метод внутренней нормировки).

Разложение субстанции под действием УФ-света. На Рис. 11 приведена хроматограмма раствора, полученного при разложении кардиотрила жестким ультрафиолетовым светом.

Как видно из Рис. 11, субстанция чувствительна к воздействию света: наблюдается незначительное увеличение содержания примесей 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (K1) и п-диметиламинобензальдегида (K2) — 0.18 % и 0.11 %, соответственно. Кроме того, под воздействием ультрафиолетового света кардиотрил окисляется и образуются ряд примесей, содержание двух из которых достаточно боль-

шое — 2.81 % и 3.35 %, соответственно (метод внутренней нормировки).

Следовательно, кардиотрил чувствителен к воздействию света, и как субстанцию, так и лекарственную форму, необходимо хранить в контейнере из темного стекла и в защищенном от света месте.

Окислительное разложение. На Рис. 12 приведена хроматограмма раствора, полученного при окислительном разложении субстанции кардиотрил.

Как видно из Рис. 12, субстанция также чувствительна к окислителю: наблюдается образование продукта окисления кардиотрила (содержание около 0.9 %). Содержание других примесей, в том числе и 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия, незначительно, и составляет 0.03 % для K1, и от 0.02 % до 0.2 % других примесей (метод внутренней нормировки).

Следовательно, кардиотрил чувствителен к окислителю, и лекарственная форма должна содержать в своем составе антиоксидант.

Исходя из приведенных хроматограмм, также можно сделать вывод, что полупродукты синтеза и примеси, образующиеся при хранении (результаты стрессового разложения) могут быть отделены от основного вещества (кардиотрила) и количественно оценены (Табл. 2).

Методика определения примесей в кардиотриле.

Приготовление испытуемого раствора. 0.025 г (точная навеска) кардиотрила помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в смеси ацетонитрил - вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения. 0.05 г (точная навеска) 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия бромидом, 0.05 г (точная навеска) п-диметиламинобензальдегида и 0.05 г (точная навеска) кардиотрила помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси ацетонитрил - вода (1:1), доводят объем раство-

Таблица 2

Условия стрессового разложения	Количественное содержание основного вещества кардиотрила, %	Массовый баланс, % (содержание основного вещества. % + содержание продуктов деградации и примесей, %)
без разложения	99.7	99.8
облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (20 см, 1.5 ч)	92.7	99.5
кислотный гидролиз 0.1 М раствором HCl (70 °C; 3 ч)	13.2	99.7
окислительное разложение 3 % раствором H ₂ O ₂ (70 °C; 3 ч)	98.8	99.5

ра тем же растворителем до метки и перемешивают. 1.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил - вода (1:1) до метки и перемешивают (0.5 % примеси).

Приготовление буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5.2 г лития дигидрофосфата, растворяют в 800 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Доводят pH полученного раствора до 3.0 кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически).

По 30 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения и смеси ацетонитрил - вода (1:1) хроматографируют, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

- колонка Kromasil C18, размером 250 мм × 4.6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм или аналогичная;
- подвижная фаза: ацетонитрил — буферный раствор (45:55), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин;
- температура колонки 35 °С;
- длина волны детектирования 215 нм.

Время хроматографирования должно быть в 3 раза больше времени удерживания основного пика.

На хроматограмме раствора сравнения порядок выхода пиков следующий: бромид-ион в «мертвом» объеме колонки, 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий-ион, п-диметиламинобензальдегид, кардиотрил.

На хроматограмме испытуемого раствора площади пиков 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромиды и п-диметиламинобензальдегида не должны превышать площади пиков 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромиды и п-диметиламинобензальдегида, соответственно, на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.5 % примеси).

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей дополнительных пиков, кроме пика 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромиды, п-диметиламинобензальдегида и пиков, времена удерживания которых совпадают со временами удерживания пиков на хроматограмме смеси ацетонитрил - вода (1:1), не должна превышать площади пика кардиотрила на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.5 % каждой примеси).

Выводы

1. Разработаны методики определения примесей в биологически активных субстанци-

ях — тиотриазолине и кардиотриле методом обращено-фазовой ВЭЖХ, позволяющие отделить и количественно определить как продукты синтеза, так и продукты распада при стрессовых условиях хранения (УФ-облучение светом ртутной лампы; кислотный гидролиз 0.1 М раствором кислоты хлористоводородной; окислительное разложение 3 % раствором водорода пероксида).

2. Учитывая, что кроме продуктов синтеза при стрессовых условиях могут образовываться дополнительные примеси, хранить субстанции тиотриазолин, кардиотрил и их лекарственные формы следует в защищенном от света месте, а их растворы должны содержать в своем составе антиоксиданты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиевский Г.В. Биологическая активность производных 1,2,4-триазола // Фармаком. - 2006. - № 3 - С. 27-31.
2. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / Мазур И.А., Волошин Н.А., Чекман И.С., Зименьковский Б.С., Стец В.Р. — Запорожье, 2005. - 156 с.
3. International Conference of Harmonization, Q2A: Text on validation of analytical procedures // US FDA Federal Register. 1995. - Vol. 60.
4. International Conference of Harmonization, Q2B: Validation of analytical procedures: methodology // US FDA Federal Register. — 1997. - Vol. 62.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. - 556 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. - Доповнення 1. — 2004. - 520 с.
7. Adamovics J.A. Chromatographic analysis of pharmaceuticals. - New York: Marcel Dekker, 1997.
8. Poole C.F., Schuette S.A. Contemporary practice of chromatography. - New York-Amsterdam-Oxford-Tokyo, 1984. - 708 p.
9. ACD/Labc 10. — Режим доступа: www.acdlabs.com
10. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. - Рига: Зинатне, 1988. — 390 с.

Резюме

Георгиевський Г.В., Куліков А.Ю.

Визначення домішок у вітчизняних субстанціях — похідних 1,2,4-триазолу — методом обернено-фазової ВЕРХ

Розроблено методики визначення домішок у біологічно активних субстанціях - похідних 1,2,4-триазолу (тіотриазоліні та кардіотрилі) методом обернено-фазової ВЕРХ. На підставі запропонованих методик вивчено стабільність субстанцій у різних стресових умовах (опроміювання розчинної субстанції жорстким ультрафіолетовим світлом (УФ-опромінення світлом ртутної лампи; кислотний гідроліз 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої; окиснювальне розкладання 3 % розчином водню пероксиду). Зроблено висновки щодо стабільності субстанцій, умов їх зберігання і селективності методу визначення домішок.

Summary

Georgiyevskiy G.V., Kulikov A.Yu.

Determination of impurities in domestic substances — derivatives of 1,2,4-thiazole by reverse-phase HPLC

Methods for determination of impurities in biologically active substances — derivatives of 1,2,4-thiazole (thiotriazoline

and cardiотрил) by reverse – phase HPLC were developed. At the basis of proposed methods stability of substances under different stress conditions (irradiation of solution of the substance by hard ultraviolet light (UV – radiation by mercury lamp light, acid hydrolysis by 0.1 M hydrochloric acid, oxidation decomposition by 3 % hydrogen peroxide) was studied. A summary concerning the stability of the substance, their storage conditions and selectivity of the method of determination of impurities was made.

Георгиевский Геннадий Викторович. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1992).

К.фарм.н. (1995). Ст. науч. сотр. отдела Государственной Фармакопеи Украины ГП УНФЦКЛС. Руководитель направления "Монографии на лекарственные субстанции" отдела ГФУ.

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

УДК 615.252:54.062:543.42.062

Подгайний Д.Г., Мерзлікін С.І., Блажеєвський М.Є.
Національний фармацевтичний університет

Спектрофотометричне визначення діакамфу та метформіну у антидіабетичному засобі

Запропоновано методику кількісного визначення діакамфу та метформіну у комбінованому препараті, капсули (0.125 г та 0.250 г, відповідно), що заснована на попередньому розділенні та спектрофотометричному визначенні компонентів за довжин хвиль 278 нм та 233 нм, відповідно. В інтервалі концентрацій (0.003-0.004) мг/мл *RSD* метформіну не перевищує 2.9 %, в інтервалі концентрацій (0.01-0.02) мг/мл *RSD* діакамфу не перевищує 2.7 %. Розроблену методику валідовано.

За експертними оцінками ВООЗ, розповсюдженість метаболічного синдрому (МС) складає близько 25 % у популяції та 75 % у хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу [1]. Головними проявами МС є ожиріння, гіперглікемія, підвищення артеріального тиску тощо, що обумовлено інсулінорезистентністю [2-4].

Фармакотерапія МС, в основному, базується на застосуванні антидіабетичних засобів, що знижують інсулінорезистентність: похідних бігуаніду (метформін) та похідних тіазолідиндіону (розиглітазон) [5, 6]. Основною причиною обмеження їх застосування є лактоацидоз, серцево-судинні ускладнення, печінкова та ниркова недостатність тощо [7, 8].

У цьому плані найбільш доцільною є комплексна терапія МС та ЦД 2 типу, у тому числі із застосуванням комбінованих антидіабетичних засобів (авадамет, глібомет, метагліб, глюкованс тощо), активні речовини яких виявляють різні механізми гіпоглікемічної дії. Однак, такі препарати виявляють побічні ефекти усіх лікарських речовин, що входять до їх складу.

Враховуючи вищенаведене, а також подібні механізми антидіабетичної дії та властивості до зниження інсулінорезистентності діакамфу [9] та метформіну, на їх основі розроблено новий фармакологічний засіб у капсулах. Експериментально доведено синергізм антидіабетичної дії між діакамфом і метформіном, що обумовило зниження терапевтичних доз даних лікарських засобів в одиниці лікарської форми у 2 рази, а новостворена фармацевтична композиція в

цілому у 5 разів менш токсична у порівнянні з метформіном [10].

Метою даної роботи є розробка методики визначення кількісного вмісту діакамфу та метформіну в капсулах методом спектрофотометрії.

Експериментальна частина

Об'єкт дослідження – капсули антидіабетичного засобу зі вмістом діакамфу 0.125 г та метформіну 0.250 г. Як стандарти використовували фармакопейні стандартні зразки Державної Фармакопеї України (ФСЗ ДФУ) діакамфу (99.0 %) та метформіну (98.9 %). Як розчини порівняння використовували 0.00125 % розчин ФСЗ ДФУ діакамфу в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та 0.000625 % водний розчин ФСЗ ДФУ метформіну. Аналітичне обладнання: спектрофотометр СФ-46, ваги ВЛР-200, мірний посуд класу А.

Методика кількісного визначення діакамфу та метформіну у капсулах

Приготування випробуваного розчину метформіну. Близько 0.5 г (точна наважка) вмісту 20 капсул поміщають у стакан місткістю 1000 мл, додають 500 мл води та ретельно перемішують протягом 5 хв. Одержану суспензію фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка» у мірну колбу місткістю 1000 мл. Осад на фільтрі промивають двома порціями, по 100 мл кожна, води. Об'єм розчину доводять тим самим розчинником до позначки та перемішують. Відбирають за допомогою піпетки 5.0 мл одержаного

розчину, поміщають у мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Осад на фільтрі використовують для приготування випробуваного розчину діакаμφу.

Приготування випробуваного розчину діакаμφу. Фільтр з осадом поміщають у стакан місткістю 500 мл, додають 300 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої та ретельно перемішують протягом 5 хв. Одержаний розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 1000 мл. Об'єм розчину доводять тим самим розчинником до позначки та перемішують. 10.0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння метформіну. 0.25 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ метформіну поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл, додають 500 мл води, ретельно перемішують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 5.0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння діакаμφу. 0.125 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ діакаμφу поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл, додають 500 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, ретельно перемішують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 10.0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Оптичну густину одержаних розчинів метформіну та діакаμφу вимірюють за довжин хвиль 233 нм та 278 нм, відповідно, на спектрофотометрі у кюветах із товщиною шару 10 мм.

Вміст метформіну та діакаμφу у капсулі, у грамах, у перерахунку на середню масу однієї капсули, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot \bar{m} \cdot P}{A_0 \cdot m \cdot 100}$$

де:

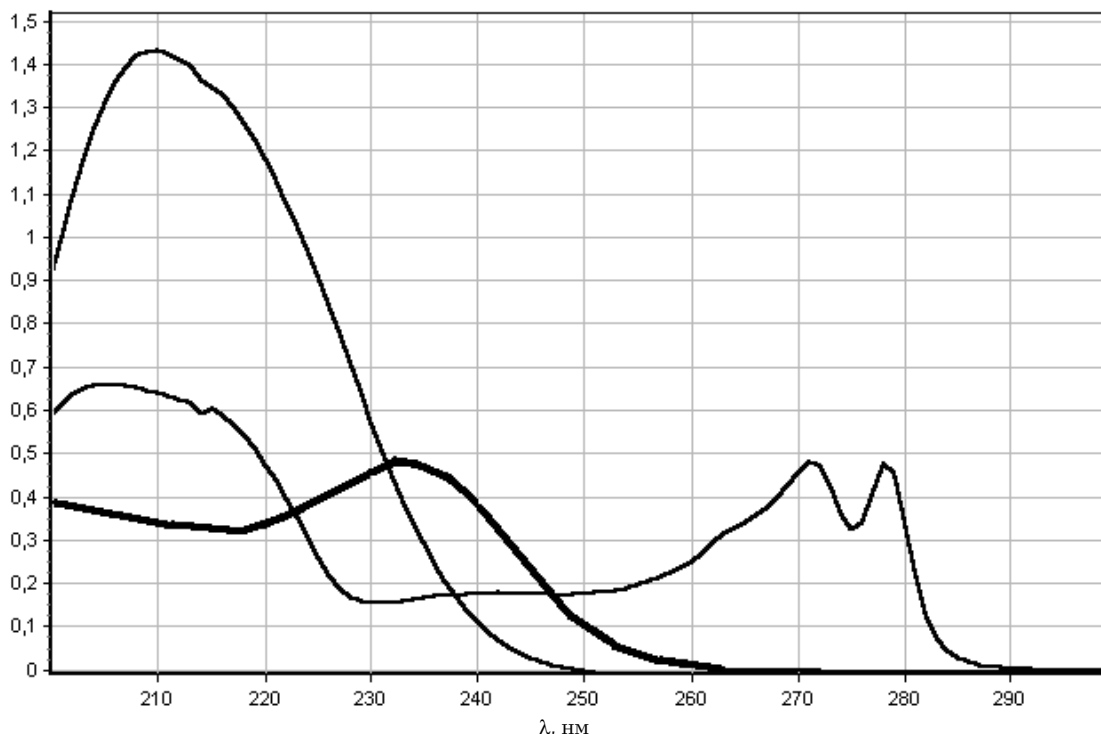
A — оптична густина випробуваного розчину;

A_0 — оптична густина розчину порівняння;

m — маса наважки вмісту капсул, у грамах;

m_0 — маса наважки ФСЗ ДФУ досліджуваної речовини, у грамах;

Рисунок 1



УФ-спектри, одержані у зазначени умовах

- 1 — УФ-спектр 0.000625 % водного розчину метформіну;
- 2 — УФ-спектр випробуваного розчину діакаμφу в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої (0.00125%);
- 3 — УФ-спектр 0.0025 % розчину метформіну в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої;
- 4 — УФ-спектр випробуваного розчину метформіну (0.000625 %).

\bar{m} — середня маса вмісте капсул, е грамах;
 P — вміст діючої речовини в ФСЗ ДФУ, у відсотках.

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що УФ-спектр поглинання метанольного розчину метформіну в області довжин хвиль від 200 нм до 300 нм характеризується максимумом за довжини хвилі (236 ± 2) нм [11]. Однак, даний розчинник достатньо токсичний. УФ-спектр водного розчину метформіну має максимум за довжини хвилі (233 ± 2) нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 754$). У межах концентрацій $(0.003-0.04)$ мг/мл світлопоглинання водних розчинів метформіну підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера, що може бути використано для його кількісного визначення. Однак, діакамф за таких умов у воді не розчинний. Експериментально встановлено, що УФ-спектр поглинання розчину діакамфу в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої має два максимуми: за довжини хвилі (273 ± 2) нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 370$) та за довжини хвилі (288 ± 2) нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 370$); підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в межах концентрацій від 0.01 мг/мл до 0.1 мг/мл ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 370$). УФ-спектр метформіну в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої характеризується смугою поглинання $\lambda_{\text{max}} 210$ нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 576$) (Рис. 1).

Оскільки спектрофотометричне визначення метформіну у присутності діакамфу в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої утруднене через накладання їх смуг поглинання в інтервалі довжин хвиль $(210-220)$ нм, було прийняте рішення перед визначенням розділити метформін і діакамф, враховуючи практичну нерозчинність останнього у воді. Для чого вміст капсул розчиняли у воді, куди переходили мет-

формін і допоміжні речовини (випробуваний розчин метформіну). Спектрофотометрично було доведено відсутність впливу допоміжних речовин на світлопоглинання метформіну. На Рис. 1 показано, що спектри поглинання випробуваного розчину (4) та водного розчину метформіну (1) є ідентичними. Випробуваний розчин діакамфу одержували шляхом розчинення осаду на фільтрі у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої.

Враховуючи вищезазначене, нами було розроблено умови спектрофотометричного визначення кількісного вмісту метформіну та діакамфу в капсулах методом стандарту.

Експериментально встановлено, що вміст метформіну у капсулі знаходиться в межах від 0.2375 г до 0.2625 г, вміст діакамфу — від 0.1188 г до 0.1313 г, що відповідає вимогам ДФУ [12]. За метрологічними характеристиками (Табл. 1) розроблені методики спектрофотометричного визначення кількісного вмісту діакамфу та метформіну дозволяють контролювати вміст зазначених речовин в одиниці дозованої лікарської форми (капсули).

Валідація спектрофотометричних методик

Згідно вимог ДФУ [12], методики кількісного визначення, що включаються до аналітичної нормативної документації, мають бути валідовані. Тому нами було проведено валідацію аналітичних методик для готового комбінованого лікарського засобу — капсул діакамфу з метформіном — за основними валідаційними характеристиками — специфічністю, лінійністю, правильністю, точністю, робастністю згідно стандартизованої процедури валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту [13].

Таблиця 1

Метрологічні характеристики кількісного визначення метформіну та діакамфу в капсулах ($n=5$, $P=0.95$)

Наважка, г	A_0	A	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
<i>метформін</i>				
0.4861	0.471	0.460	0.2484	$\bar{X} = 0.2482$ $S = 0.001267$ $S_{\bar{x}} = 0.00057$ $\Delta\bar{x} = 0.001575$ $\bar{\epsilon} = 0.63$ $RSD = 0.51 \%$
0.4979		0.469	0.2472	
0.5052		0.476	0.2473	
0.5118		0.488	0.2503	
0.5232		0.494	0.2478	
<i>діакамф</i>				
0.4861	0.463	0.452	0.1243	$\bar{X} = 0.1239$ $S = 0.00029$ $S_{\bar{x}} = 0.00013$ $\Delta\bar{x} = 0.00036$ $\bar{\epsilon} = 0.29$ $RSD = 0.24 \%$
0.4979		0.462	0.1240	
0.5052		0.467	0.1235	
0.5118		0.474	0.1238	
0.5232		0.485	0.1239	

Специфічність. Специфічність методики обґрунтовується відсутністю впливу на світлопоглинання метформіну та діакамфу інших компонентів препарату, а також відсутністю продуктів розпаду метформіну та діакамфу.

Дослідження фонового поглинання проводили до випробування модельних розчинів. Вимірювали оптичні густини (A_{blank}) розчинів плацебо для діакамфу та метформіну виконуючи не менше трьох вимірювань із вийманням кювети. Має виконуватися співвідношення:

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100 \leq 0.1 \cdot B = 0.1 \cdot 5 = 0.5 \%$$

Знайдено для діакамфу:

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100 = \frac{0.0020}{0.4630} \cdot 100 = 0.432 \leq 0.5 \%$$

Знайдено для метформіну:

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100 = \frac{0.0022}{0.4710} \cdot 100 = 0.467 \leq 0.5 \%$$

Із отриманого співвідношення видно, що вплив фонового поглинання на результати вимірювання є незначним.

Лінійність. Лінійність визначали в межах (80-120) % від номінальних концентрацій діакамфу та метформіну. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення відповідних модельних сумішей і проводили визначення за загальною методикою. На основі отриманих даних будували графіки залежності оптичної гус-

тини від концентрації досліджуваних речовин у нормалізованих координатах (Рис. 2-3).

Методом найменших квадратів за всіма розчинами діакамфу та метформіну була розрахована залежність відношення оптичних густин $Y_i\% = (A_i/A_{st}) \cdot 100$ від відношення концентрацій $X_i\% = (C_i/C_{st}) \cdot 100$, тобто залежність $(A_i/A_{st}) \cdot 100 = b \cdot (C_i/C_{st}) \cdot 100 + a$; $Y_i = b \cdot X_i + a$. Знайдено для діакамфу $Y_i = 1.0227 \cdot X_i - 1.9$ та для метформіну: $Y_i = 1.0009 \cdot X_i + 0.14$

Отримані величини $b, s_b, a, s_a, s_b/b, r$ (коефіцієнт кореляції) представлено в Табл. 2.

Як видно з Табл. 2, виконуються всі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій (80-120) %.

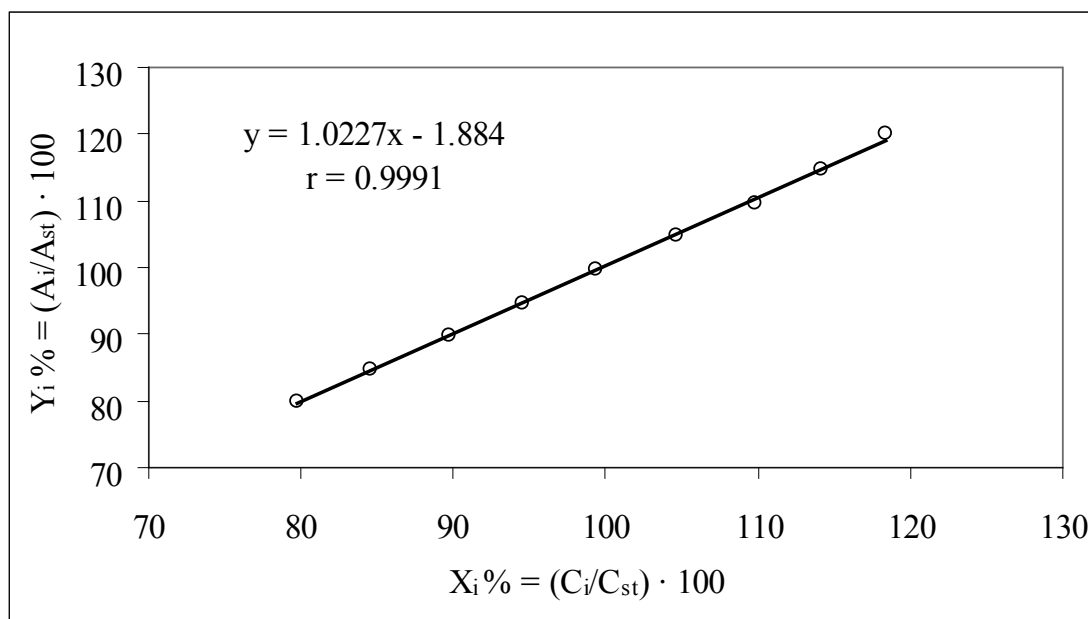
Прецизійність і правильність. Результати визначення прецизійності та правильності представлено в Табл. 3.

Методика є точною на рівні прецизійності, так як знайдені значення систематичної похибки для діакамфу та метформіну менше регламентованих допусків вмісту ($\% \leq 1.60$).

Внутрішньолабораторна точність. Дослідження внутрішньолабораторної точності проводили на 5 пробах однієї серії препарату. Відбирали 5 проб одного зразка препарату та проводили аналіз для кожної проби. Розраховували метрологічні характеристики по відношенню оптичних густин отриманих (A_i) до оптичних густин розчину порівняння (A_{st}) (дослід 1).

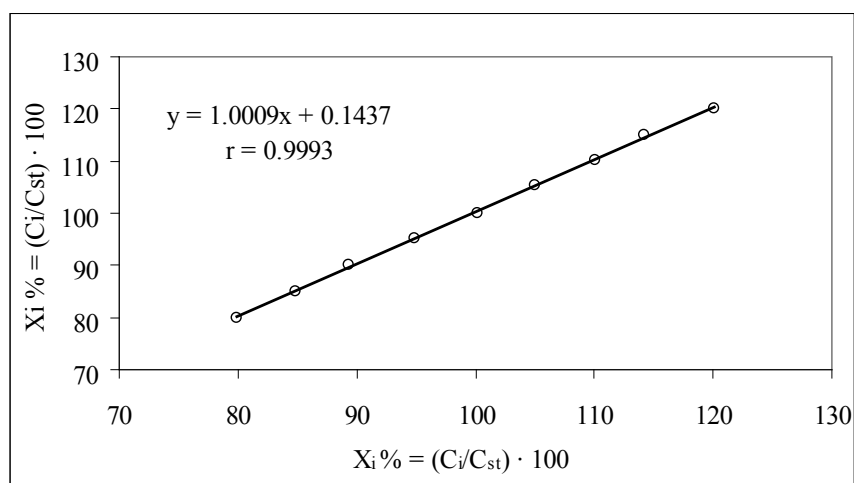
Проводили аналіз того самого зразка, із тим самим числом паралельних проб на іншому

Рисунок 2



Залежність відношення оптичної густини від відношення концентрації розчинів діакамфу

Рисунок 3



Залежність відношення оптичної густини від відношення концентрації розчинів метформіну

спектрофотометрі іншим аналітиком (дослід 2). Потім проводили аналіз того самого зразка в інший день і з використанням іншого мірного посуду (дослід 3). Аналогічно розраховували метрологічні характеристики по відношенню оптичних густин отриманих розчинів (A_i) до оптичної густини розчину порівняння (A_{st}). Результати представлені у Табл. 4.

Методика є точною на рівні внутрішньолабораторної точності, оскільки величини відношень оптичних густин отриманих розчинів (A_i) до оптичної густини розчину порівняння (A_{st}) \bar{X} для різних дослідів є статистично нерозрізненими (для максимальної різниці між величинами \bar{X} різних дослідів (k, j) виконується співвідношення: $\max |\bar{X}_k - \bar{X}_j| \leq 2.52 \cdot S_0 = 1.414 \cdot 1.782 \cdot S_0$, (для діакамфу $0.6820 < 2.0245$, для метформіну $0.9440 < 1.7181$).

Робастність. Найважливішою характеристикою (оскільки рН фіксується – буфер) є стійкість аналізованого розчину у часі. Проводили вимірювання оптичної густини (A) випробуваних розчинів діакамфу та метформіну, відповідних розчинів порівняння (тричі з вийманням кювети) після приготування розчинів через 15 хв, 30 хв, 45 хв і 60 хв.

Встановлено, що зміни A незначущі у порівнянні із граничною невизначеністю аналізу, тобто не перевищують 0.1 від допуску ($\pm 5\%$) і розчини є стійкими у досліджуваному інтервалі часу.

Повна невизначеність аналізу. Повну невизначеність аналізу обчислювали за формулою:

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

де:

Δ_{SP} — невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} — прогнозована невизначеність вимірювань (кінцева аналітична операція) = 0.70% [13].

Визначено для діакамфу

$$\Delta_{As} = \sqrt{0.749^2 + 0.7^2} = 1.025 < 1.6;$$

для метформіну

$$\Delta_{As} = \sqrt{0.868^2 + 0.7^2} = 1.115 < 1.6.$$

Як видно, прогнозована невизначеність не перевищує максимально допустиму невизначеність 1.6 % для допусків $\pm 5\%$.

Таблиця 2

Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення		Критерії (для допусків (95-105) %, число точок 9)		Висновок (відповідає або не відповідає)	
	діакамф	метформін	діакамф	метформін	діакамф	метформін
b	1.0227	1.0009				
s_b	0.012	0.0098				
a	-1.884	0.1437	≤ 2.60	≤ 2.60	відповідає	відповідає
s_a	1.176	0.9853				
s_a/b	0.4302	0.3797	≤ 0.84	≤ 0.84	відповідає	відповідає
r	0.9991	0.9993	≥ 0.99810	≥ 0.99810	відповідає	відповідає

Таблиця 3

Результати аналізу модельних сумішей діакамфу та метформіну та їх статистична обробка

Розчин	Концентрації компонентів					
	Введено в % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$		Знайдено в % до концентрації розчину порівняння $(A_i/A_{st}) \cdot 100\%$		Знайдено в % до введеного $X_i = (A_i/A_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$	
	діакамф	метформін	діакамф	метформін	діакамф	метформін
1	79.80	79.94	79.81	79.96	100.0125	100.0250
2	84.54	84.82	84.76	85.06	100.2602	100.2830
3	89.73	89.28	89.87	90.01	100.1560	100.8177
4	94.53	94.82	94.74	95.05	100.2222	100.2426
5	99.31	100.22	99.85	99.94	100.5438	99.7210
6	104.59	105.03	104.74	105.25	100.1434	100.2095
7	109.78	110.05	109.70	110.14	99.92713	100.0818
8	114.20	114.24	114.72	115.09	100.4553	100.7440
9	118.33	120.06	119.96	120.06	101.3775	100.0000
\bar{X}					100.3442	100.2360
Відносне стандартне відхилення, $s_x\%$					0.43	0.35
Відносний довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%, 8) s_x = 1.860 s_x =$					0.80	0.65
критичне значення для збіжності результатів $\Delta\% \leq$					1.60	1.60
систематична похибка $\delta = X-100 $					0.3442	0.2360
критерій незначущості систематичної похибки $\delta \leq \Delta \cdot 0.32;$ $\delta_{діакамфу} = 0.3442 \leq 0.51$ $\delta_{метформіну} = 0.2360 \leq 0.51$					віко-нується	віко-нується
загальний висновок про методику:					коректна	коректна

Висновки

1. Розроблено методики спектрофотометричного визначення кількісного вмісту діакамфу та метформіну в капсулах нового комбінованого антидіабетичного засобу.

2. Проведено процедуру валідації методик кількісного визначення діакамфу та метформіну в готовому комбінованому лікарському засобі у вигляді капсул.

ЛІТЕРАТУРА

1. Zimmet P., Shaw J., Alberti G. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view // Diabetic medicine. – 2003. – Vol. 20 (9). – P. 693–702.
2. Tuomilehto J., Lindstrom H., Laakso M. The Finnish diabetes

prevention study group: prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344. – P. 1343–1350.

3. Lopez-Candales A. Metabolic syndrome X: a comprehensive review of the pathophysiology and recommended therapy // J. Med. – 2001. – № 32. – P. 283-300.

4. Bonora E., Kiechl S., Willeit J. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study // Diabetes. – 1998. – Vol. 47 (10). – P. 1643-1649.

5. Cusi K., DeFronzo R.A. Metformin: A review of its metabolic effects // Diabetes Rev. – 1998. – Vol. 6. – P. 89–131.

6. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones // N. Eng. J. Med. – 2004. – Vol. 351. – P. 1106-1118.

7. Sulkin T.V., Bosman D., Krentz A.J. Contraindications to metformin therapy in patients with NIDDM // Diabetes Care. – 1997. – Vol. 20. – P. 925928.

Таблиця 4

Результати перевірки внутрішньолабораторної точності

№ Дос-ліду	$\bar{X}(\%)$		$S_x(\%)$		$\Delta \bar{X}(\%)$		$S_0(\%)$		$\max \bar{X}_k - \bar{X}_j $	
	A*	M**	A	M	A	M	A	M	A	M
1	99.41	99.404	0.5256	0.4830	0.5009	0.4603	0.8034	0.6818	0.682	0.944
2	100.10	99.568	0.7620	0.5897	0.7262	0.5620				
3	99.96	100.348	1.0388	0.9020	0.9900	0.8600				
<p>знайдено для діакамфу: $\max \bar{X}_k - \bar{X}_j = 100.092 - 99.41 = 0.682 < 2.52 \cdot S_0 = 2.52 \cdot 0.8034 = 2.0245$ знайдено для метформіну: $\max \bar{X}_k - \bar{X}_j = 100.348 - 99.404 = 0.944 < 2.52 \cdot S_0 = 2.52 \cdot 0.6818 = 1.7181$</p>										

Примітки:

* — діакамф,

** — метформін.

8. Page Robert Lee, Gozansky Wendolyn S., Ruscin J. Possible heart failure exacerbation associated with rosiglitazone: Case report and literature review // *Pharmacotherapy*. — 2003. — Vol. 23, № 7. — P. 945-954.

9. Пат. 2205826 (2000). Російська Федерація // Опубл. 10.06.03. — Бюл. № 16.

10. Обґрунтування створення нового комбінованого антидіабетичного засобу для лікування проявів метаболічного синдрому за результатами клінічної апробації діакамфу // Мерзлікін С.І., Подгайний Д.Г., Соколюк Т.В., Горбенко Н.І. / *Лекарства — человеку: современные проблемы создания, исследования и апробации лекарственных средств: Материалы XXV юбилейной научно-практической конференции с международным участием*. - Х.: Изд-во НФаУ, 2008. - С. 324-328.

11. Clarke's isolation and identification of drugs. — London: The Pharmaceutical Press, 1986. — Vol. 2. — P. 141.

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

13. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методики контроля качества лекарственных средств // *Фармаком*. — 2006. — № 1/2. — С. 35-44.

Резюме

Подгайний Д.Г., Мерзликін С.И., Блажеевский Н.Е.

Спектрофотометрическое определение диакамфа и метформина в антидиабетическом средстве

Предложена методика количественного определения диакамфа и метформина в комбинированном препарате, капсулы (0.125 г и 0.250 г, соответственно), основанная на предварительном разделении и спектрофотометрическом

определении компонентов при длине волн 278 нм и 233 нм соответственно. В интервале концентраций (0.003 — 0.004) мг/мл *RSD* метформина не превышает 2.9 %, в интервале концентраций (0.01 — 0.02) мг/мл *RSD* диакамфа не превышает 2.7 %. Разработанная методика валидирована.

Summary

Podgayniy D.G., Merzlikin S.I., Blazheyevskiy M.Ye.

Spectrophotometric determination of diacamph of metformin in antidiabetic drug

The method of assay of diacamph and metformin in combined drug, capsules (0.125 g and 0.250 g, respectively), what has been based on prior separation of spectrophotometric assay of components at wave length 278 nm and 233 nm, respectively, was proposed. In the interval of concentrations (0.003-0.004) mg/ml *RSD* of metformin did not exceed exceed 2.9 % and (0.01-0.02) mg/ml of diacamph — 2.7 %. Developed method was validated.

Подгайний Дмитро Григорович. Аспірант кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (2006).

Мерзлікін Сергій Іванович. Д.фарм.н. (2004). Професор (2006). Професор кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (2006).

Блажеєвський Микола Євстахійович. Д.х.н. (2006). Доцент (1999). Професор кафедри фізичної та колоїдної хімії Національного фармацевтичного університету (2007).

Фармакологічні дослідження

УДК 615.273.001.53

Крамаренко Е.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции»

Сравнительная оценка фармакологического действия отечественного препарата Апротинин 200000 КИЕ и препарата Гордокс 100000 КИЕ

Приведены результаты экспериментальных исследований в опытах *in vitro* и на животных специфической фармакологической активности отечественного препарата Апротинин, 200000 КИЕ, раствор для инъекций, в сравнении с референтным препаратом Гордокс, 100000 КИЕ, раствор для инъекций. Не установлено достоверно значимых различий в проявлении ингибирующего, в отношении трипсина, и антифибринолитического действия препаратов.

Апротинин относится к группе поливалентных ингибиторов протеаз. Изучение структуры и фармакологических свойств апротинина ведется с 50-х годов прошлого столетия [1-3].

В настоящее время известно, что лекарственные средства, содержащие белковые ингибиторы протеаз, эффективно регулируют активность систем кининообразования, гемокоагуляции, фибринолиза и комплемента, нормализуют антипротеазные ресурсы крови, являются протекторами клеточных повреждений, стабилизи-

руя проницаемость мембран, препятствуют выходу протеаз из лизосом, тормозят активность нейтральных протеаз поврежденных тканей и лейкоцитов, нормализуют воспалительную реакцию и уменьшают зону некроза [3].

Благодаря указанным свойствам препараты ингибитора протеаз апротинина получили широкое распространение в медицинской практике. Достаточно подробно, с учетом механизмов действия, применение апротинина освещено в работах Шульпековой Ю.О. и соавт. [4, 5]

Поскольку апротинин активирует процесс коагуляции и препятствует фибринолизу, а также обладает сберегающим тромбоциты действием, в клинике его применяют при реологических расстройствах. Прежде всего, он является средством первой необходимости при ведении пациентов с кровотечениями на почве ДВС-синдрома в хирургической, акушерской, гинекологической, терапевтической практике. Наличие указанных свойств обуславливает его применение при профилактике и купировании кровотечений на фоне гиперфибринолиза в травматологии, онкологии и гематологии. Апротинин предотвращает интра- и послеоперационные кровотечения, требующие переливания препаратов крови и повторных торакотомий при применении аппаратов искусственного кровообращения в кардиохирургии.

Применение апротинина в профилактических целях особенно показано у пациентов, которым нежелательно проводить переливание крови.

При проведении операций с использованием экстракорпорального кровообращения, особенно у лиц пожилого возраста, апротинин уменьшает риск развития нарушений мозгового кровообращения.

Препараты апротинина также нашли свое применение в трансплантологии [4, 5].

Использование апротинина в терапевтической практике — это, прежде всего, лечение ожогов. Так, внутривенное введение апротинина показано при развитии ожогового шока, острой ожоговой токсемии; в сочетании с антибиотиками он положительно воздействует на регенерацию тканей ожоговых ран [4-6].

Данные литературы свидетельствуют, что препараты апротинина достаточно широко применяют в офтальмологии. Лечебное действие инстилляции апротинина показано при гнойном язвенном кератите [7]. Предложен новый, альтернативой хирургическому, способ медикаментозной профилактики цилиохориоидальной отслойки после антиглаукоматозных операций, который состоит в местном применении апротинина [8].

Апротинин способен ингибировать протеолитические процессы, происходящие при синтезе вирусных полипептидов, а также слияние вирусов с мембранами клеток, поэтому препараты на его основе могут использоваться при тяжелых формах респираторных инфекций с высокой активностью воспаления, обычно при признаках ДВС-синдрома (как ингибиторы фибринолиза) и расстройствах микроциркуляции [4, 9].

В настоящее время целесообразность применения антиферментных средств, ингибиторов протеаз при панкреатитах оспаривается многими учеными. По этому поводу имеются обширные и противоречивые данные литературы [4, 5, 10-14].

Однако, инактивируя калликреин (предшественник кининов, в норме образующихся в организме в незначительных количествах, необходимых для осуществления регуляции ряда физиологических функций), апротинин препятствует развитию отека и боли, улучшает капиллярный кровоток, ограничивает развития некроза поджелудочной железы и системных осложнений при остром панкреатите [10, 13].

Показано, что назначение апротинина снижает риск развития острого панкреатита как осложнения эзофагохолангиопанкреографии [4].

В последнее время установлено также, что применение препаратов апротинина во время и после хирургических операции позволяет значительно уменьшить посттравматические изменения в тканях, интенсивность послеоперационного болевого синдрома и потребность в опиоидных анальгетиках.

Внутривенная инфузия апротинина (30000 — 50000 ЕД в течение 2 — 3 сут.) в сочетании с НПВС, опиоидом, блокатором каналов кальция и антагонистом ВАК позволяет нейтрализовать остроту нейропатического хронического болевого синдрома и в дальнейшем контролировать боль путем использования традиционных анальгетиков [15, 16].

Наличие анальгезирующего действия [17] у препаратов апротинина позволило применять их в клинике при лечении больных с абдоминальным синдромом при инфаркте миокарда [18]; при лечении больных с сильными хроническими болями, связанными с поясничной дископатией [19]; в комплексной терапии первичного деформирующего остеоартроза и др. Причем, в случаях дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов при его назначении отмечено не только уменьшение боли, но и торможение дегенерация хряща и сдерживание выхода из него протеогликанов [20].

В литературе имеются единичные сведения о более успешном лечении хронического простатита в случаях включения в комплексную терапию препаратов апротинина [21].

Ряд данных свидетельствует о целесообразности использования апротинина в дерматологии при псориазе, экземе и др. [22-24].

В последнее время появились данные о применении апротинина для купирования абстиненции у больных опийной наркоманией.

Известно, что в клинической картине всех вариантов наркоманий прослеживаются определенные периоды: интоксикация, острая абстиненция, период постабстинентных расстройств, этап формирования терапевтической ремиссии, поэтому лечение строится с учетом периода заболевания. Установлено, что аprotинин в значительной степени редуцирует алгические, сенестопатические и вегетативные нарушения в рамках острого опийного абстинентного синдрома, в результате чего быстрее наступает улучшение [25].

Несмотря на указанное, широкое применение препаратов аprotинина сдерживается их относительно высокой стоимостью.

Ассортимент препаратов на основе аprotинина в Украине невелик: Контрикал 10000 АтрЕ (AWD, Германия) и Гордокс 100000 КИЕ, («Gedeon Richter», Венгрия). Отечественные препараты на основе аprotинина не производятся, хотя их производство налажено во Франции, Германии, США, Австрии, Венгрии, Италии, Польше, Японии и Индии. Учитывая, что в настоящее время препараты аprotинина включены в перечень жизненно важных лекарственных средств, является актуальным их воспроизводство на основе импортных субстанций.

Целью данной работы является сравнительное изучение специфической фармакологической активности препарата Аprotинин 200000 КИЕ производства ЗАО «Индар» и препарата Гордокс 10000 КИЕ производства «Gedeon Richter» (Венгрия).

Объекты и методы

Объектом изучения являлся препарат Аprotинин, раствор для инъекций, 200000 КИЕ, во флаконах по 10 мл, производства ЗАО «Индар» следующего состава: 1 мл раствора содержит аprotинин концентрированный и вспомогательные вещества.

Исследования специфической фармакологической активности препарата Аprotинин проводили в сравнении с препаратом Гордокс, раствор для инъекций, 100000 КИЕ, в ампулах по 10 мл, производства «Gedeon Richter» (Венгрия).

Специфическое фармакологическое действие препаратов изучали *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* действие препаратов оценивали по методу Astrup на фибриновых пластинах [26] в нашей модификации, которая основана на способности аprotинина к образованию ферментно-ингибиторных комплексов с трипсином.

Для активации фибринолиза в чашках Петри использовали раствор трипсина кристаллического (ЗАО «Трудовой коллектив Киевского предприятия по производству бактериальных препаратов «Биофарма») в концентрации 4 мг/мл. Фибриновые пластины, на поверхность которых наносили раствор трипсина (0.02 мл), служили контролем.

В опыте раствор трипсина кристаллического и ингибитора инкубировали при температуре 37 °С в течение 15 мин, затем указанную смесь (по 0.02 мл) наносили на поверхность фибриновых пластин. Пластины помещали в термостат и через (18-20) ч инкубации определяли диаметр зон лизиса фибрина и рассчитывали площадь зон лизиса в мм².

Эффект (в процентах) оценивали по способности ингибиторов протеаз уменьшать площадь зоны лизиса, индуцированного трипсином.

Ингибирование лизиса (ИЛ), в процентах вычисляли по формуле:

$$100 \% - \frac{S_{mp. + инг.} \times 100 \%}{S_{mp.}}$$

где:
 S_{mp} — площадь лизиса фибриновых пластин, индуцированного трипсином;

Таблица 1

Влияние препаратов Аprotинин и Гордокс на лизис фибриновых пластин, обусловленный трипсином (n=6)

Трипсин + препарат в концентрации КИЕ/мл	Аprotинин ЗАО «Индар»		Гордокс «Gedeon Richter»	
	зона лизиса, мм ²	процент ингибирования	зона лизиса, мм ²	процент ингибирования
0	1742.97 ± 138.54	0	1742.97 ± 138.54	0
2500	859.40 ± 82.42*	50.7	867.18 ± 67.58*	50.3
5000	172.43 ± 28.74*	90.1	176.58 ± 13.17*	89.9
10000	148.48 ± 8.60*	91.5	136.95 ± 13.31*	92.2

Примечания:

* — достоверность различия по отношению к данным, полученным для лизиса фибрина трипсином в отсутствии препаратов;

** — достоверность различия по отношению к данным референтного препарата (p ≤ 0.05).

$S_{mp.+ инг.}$ — площадь лизиса фибриновых пластин, индуцированного смесью трипсина и ингибитора.

Ингибирующую активность Апротинина в экспериментах *in vitro* изучали в диапазоне концентраций: 2500 КИЕ/мл; 5000 КИЕ/мл и 10000 КИЕ/мл. Препарат сравнения Гордокс вводили в смесь в соответствующих концентрациях.

Экспериментальную модель гиперфибринолиза вызывали внутривенным введением белым беспородным крысам массой (210-250) г раствора трипсина кристаллического, который в больших дозах способен активировать фибринолиз крови [1, 27]. Оценку системы свертывания крови проводили по результатам данных гемокоагулограмм, регистрируемых на электрокоагулографе Н-333, в динамике: исходная, через 30 мин, 90 мин и 180 мин после активации фибринолиза трипсином.

При проведении эксперимента животные были разделены на три группы, по 6 особей в каждой: 1 — контроль-патология; 2 — группа животных с патологией, леченная Апротинином; 3 — группа животных с патологией, леченная Гордоксом.

Изучаемые препараты Апротинин и Гордокс вводили животным за 30 мин до введения трипсина, внутривенно в дозе 18145 КИЕ/кг, что соответствует рекомендованному диапазону доз для человека ((200000-500000) КИЕ) [28-30] с учетом коэффициентов пересчета активных доз препарата на крысу по Рыболовлеву Ю.Р. [31].

Во время эксперимента с животными работали согласно правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей. Биоэтические аспекты протокола исследований одобрены Комиссией по биоэтике ГП ГНЦАС (протокол № 17 от 12.09.06 г).

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

В последние годы наибольшее внимание привлекают гемостатические свойства апротинина. Это свойство антифибринолитика особенно ценно в условиях неконтролируемой активации плазминогена тканевыми факторами, что сопровождается развитием гиперфибринолитических кровотечений. Образуя комплекс с плазмином, препарат подавляет его протеолитическое влияние на фибрин [1-4]. Наличие и подтверждение этого свойства в исследуемом препарате и легло в основу эксперимента.

Результаты эксперимента по изучению специфической фармакологической активности исследуемого препарата в опытах *in vitro* представлены в Табл. 1.

В экспериментах *in vitro* установлено (Табл. 1), что препараты Апротинин и Гордокс проявляют ингибирующее действие — значительно уменьшают площадь зон лизиса фибриновых пластин трипсином. Так, в концентрации 2500 КИЕ/мл препараты подавляют лизис фибрина на 50.7 % и

Таблица 2

Влияние препаратов Апротинин и Гордокс на некоторые показатели коагулограмм у крыс при экспериментальном гиперфибринолизе (n=6)

Группа животных	Показатель	Время забора крови, мин			
		исходное	30	90	180
контроль-патология	A_{min}	0.051±0.001	0.413±0.11*	0.389±0.12*	0.18±0.03*
	$A_{10'}$	0.055±0.005	0.68±0.095*	0.62±0.13*	0.52±0.08*
	T_3	944.3±59.0	341.0±62.1*	441.7±33.7*	404.0±20.7*
патология + Апротинин в дозе 18145 КИЕ/кг	A_{min}	0.051±0.001	0.056±0.006**	0.07±0.012***	0.07±0.02****
	$A_{10'}$	0.055±0.005	0.081±0.013**	0.10±0.022*/***	0.11±0.029*/****
	T_3	944.3±59.0	889.3±83.6**	801.0±124.4***	766.8±93.1****
Патология + Гордокс в дозе 18145 КИЕ/кг	A_{min}	0.051±0.001	0.064±0.009**	0.067±0.011***	0.07±0.012****
	$A_{10'}$	0.055±0.005	0.079±0.015**	0.063±0.025*/***	0.12±0.034*/****
	T_3	944.3±59.0	767.4±53.5**	860.0±107.0***	748.0±38.3****

Примечания:

- A_{min} — минимальная амплитуда, характеризующая плотность сгустка, в относительных единицах;
- $A_{10'}$ — амплитуда через 10 мин после начала ретракции и фибринолиза, характеризующая показатель гематокрита, в относительных единицах;
- T_3 — времени начала ретракции и фибринолиза, в секундах.
- * — достоверность различия по отношению к исходным данным ($p \leq 0.05$);
- ** , *** , **** — достоверность различия по отношению к данным патологии на 30 минуте, 90 минуте и 180 минуте, соответственно ($p \leq 0.05$).

50.3 %, в концентрации 5000 КИЕ/мл — на 90.1 % и 89.9 %, соответственно (различие в действии препаратов недостоверно). Дальнейшее увеличение дозы препаратов (до 10000 КИЕ/мл) практически не изменяет процент ингибирования зоны лизиса фибриновых пластин трипсином. Установленный эффект по влиянию препаратов на активность трипсина свидетельствует о выраженном ингибирующем действии исследуемого препарата Апротинин, которое соответствует аналогичному действию на трипсин препарата сравнения Гордокс в эквивалентных концентрациях.

На модели экспериментальной патологии (гиперфибринолиза) у крыс (Табл. 2) установлено, что однократное внутривенное введение животным трипсина в дозе 10 мг/кг приводит к выраженному нарушению процесса свертывания крови, о чем свидетельствует резкое увеличение показателей минимальной амплитуды (A_{min}) и амплитуды через 10 мин после начала ретракции и фибринолиза (A_{10}), а также снижение времени начала ретракции и фибринолиза (T_3).

Так, при внутривенном введении трипсина у животных на 30 минуте наблюдения отмечается достоверное увеличение показателя минимальной амплитуды (A_{min}) в 8.1 раза. Указанный показатель остается достоверно высоким на 90 минуте (в 7.6 раза) и на 180 минуте (в 3.5 раза) эксперимента.

Показатель амплитуды через 10 мин после начала ретракции и фибринолиза A_{10} , характеризующий показатель гематокрита, на 30 минуте при внутривенном введении трипсина животным увеличивается по сравнению с исходными данными в 12.4 раза. На 90 минуте эксперимента указанный показатель достоверно превышает исходный уровень в 11.8 раз, на 180 минуте — в 9.5 раз.

Время начала ретракции и фибринолиза (T_3) при внутривенном введении животным трипсина уменьшается. Так, на 30 минуте эксперимента отмечается уменьшение времени ретракции в 2.8 раза, далее наблюдается незначительное его увеличение, однако, по сравнению с исходным значением, на 90 минуте показатель снижен в 2.1 раза, на 180 минуте — в 2.3 раза.

Следовательно, введение трипсина резко изменяет указанные показатели системы свертывания крови у крыс, и наблюдается картина острого гиперфибринолиза.

Предварительное введение животным препарата Апротинин в дозе 18145 КИЕ/кг сдерживает развитие гиперфибринолиза у крыс, вызванного внутривенным введением трипси-

на. Так, показатели амплитуды A_{min} , A_{10} и время начала ретракции и фибринолиза T_3 через 30 мин после внутривенного введения животным активатора фибринолиза (трипсина), находятся в пределах исходных данных, что свидетельствует об отсутствии изменения показателя гематокрита и нормальном образовании сгустка крови при свертывании.

На 90 минуте эксперимента после введения препарата Апротинин показатель A_{min} по сравнению с исходным значением повышен в 1.4 раза, что достоверно (в 5.6 раз) ниже указанного показателя крови у животных с патологией; показатель амплитуды A_{10} крови, который характеризует гематокрит, хотя в 1.8 раз выше по сравнению с исходным значением, однако значительно (в 6.2 раза) ниже, чем в группе нелеченных животных; показатель времени начала ретракции и фибринолиза (T_3) у животных достоверно выше (в 1.8 раза) указанного значения нелеченных животных.

Предварительное введение препарата способствует сохранению показателей, характеризующих процесс свертывания крови у животных, примерно на уровне нормы и на 180 минуте. Так, показатель амплитуды A_{min} у животных под влиянием препарата Апротинин остается значительно (в 2.6 раза) ниже, чем у животных с патологией; показатель амплитуды A_{10} — в 4.7 раза ниже, чем в группе нелеченных крыс; время начала ретракции и фибринолиза удерживается на уровне исходного значения, и в 1.9 раза выше, чем в этот временной интервал у нелеченных животных.

Аналогичные результаты получены при профилактическом введении животным препарата Гордокс в эквивалентной дозе (18145 КИЕ/кг). Статистически достоверных различий в действии исследуемого препарата и препарата сравнения не выявлено. Так, показатели амплитуды A_{min} , A_{10} и время начала ретракции и фибринолиза T_3 через 30 мин после внутривенного введения животным трипсина при профилактическом введении препарата Гордокс в эквивалентной дозе, находятся в пределах исходных данных (что свидетельствует об отсутствии изменения показателя гематокрита и нормальном образовании сгустка крови при свертывании).

На 90 минуте эксперимента при предварительном введении препарата сравнения показатель A_{min} и показатель амплитуды A_{10} по сравнению с исходными значениями несколько повышены (соответственно в 1.3 и 1.5 раза), однако достоверно ниже (соответственно в 5.8 и 7.5 раза), чем у животных с патологией. Показатель времени начала ретракции и фибринолиза (T_3) у животных при предварительном

введении препарата сравнения достоверно выше (в 1.9 раза) указанных значений нелеченных животных.

Предварительное введение препарата Гордокс, также способствует сохранению показателей, характеризующих процесс свертывания крови у животных, примерно на уровне нормы и на 180 минуте: показатель амплитуды A_{min} остается значительно (в 2.6 раза) ниже, чем у животных с патологией; показатель амплитуды $A_{10'}$, — в 4.3 раза ниже, чем в группе нелеченных крыс; время начала ретракции и фибринолиза удерживается на уровне исходного значения, и в 1.85 раза выше, чем в этот временной интервал у нелеченных животных.

Таким образом, предварительное внутривенное введение как препарата Апротинин, так и препарата сравнения — Гордокс, в эквивалентной дозе (18145 КИЕ/кг) сохраняет исследуемые показатели (продолжительность процесса свертывания крови, плотность сгустка, показатель гематокрита) на уровне близких к исходным данным в течение эксперимента.

Выводы

Апротинин производства ЗАО «Индар» в опытах *in vitro* обладает ингибирующим в отношении трипсина действием; выраженность эффекта зависит от его концентрации.

Апротинин производства ЗАО «Индар» в эксперименте на животных подавляет фибринолиз, вызванный внутривенным введением трипсина, что выражается в нормализации процесса свертывания крови (данных гемокоагулограмм, продолжительности свертывания, плотности сгустка, показателя гематокрита).

По специфическому фармакологическому действию препарат Апротинин (ЗАО «Индар») не имеет отличий от референтного препарата Гордокс («Gedeon Richter», Венгрия) в эквивалентных концентрациях и дозах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меркулов М.Ф., Малюгина И.Б. Ингибиторы фибринолиза // Фармакология и токсикология. — 1969. — № 3. — С. 362-375.
2. Сыновец А.С., Левицкий А.П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. — К.: Здоров'я, 1985. — 72 с.
3. Природные ингибиторы протеиназ как основа для создания новых лекарственных средств / Ларионова Н.И., Балабушевич Н.Г., Гладышева И.П., Мороз Н.А., Казанская Н.Ф. и др. // Вопросы медицинской химии. — 1994. — № 3. — С. 25-31.
4. Шульпекова Ю.О., Ивашкин В.Т. Апротинин — важный компонент терапии критических состояний // Русский медицинский журнал. — 2000. — Т. 8, № 7. — С. 296-299.
5. Шульпекова Ю.О. Механизмы действия апротинина в лечении болезней печени и поджелудочной железы // Русский медицинский журнал. — 2000. — Т. 8, № 17. — С. 704-706.

6. Применение ингибиторов протеиназ для лечения ожоговых ран / Кадышев Ю.Г., Левицкий А.П., Литвинов П.Г. и др. // Клиническая хирургия. - 1992. - № 3. - С. 42 — 44.
7. Осташевский В.Л., Горгиладзе Т.У. Лечебное действие инстиляции контрикала при гнойном язвенном кератите // Офтальмологический журнал. — 1984. — № 6. — С. 350-353.
8. Черкунов Б.Ф., Мироненко Л.В. Медикаментозная профилактика послеоперационной цилиохориоидальной отслойки местным применением контрикала // Там же. — 1998. — № 1. — С. 49-51.
9. Таточенко В. К. Лечение острых респираторных заболеваний у детей // Лечащий врач. — 2005. — № 7. - Режим доступа: <http://www.medline.ru>.
10. Мосийчук Л.Н., Бондаренко Т.В., Васильева И.А. Клинический опыт применения апрокала при хроническом рецидивирующем панкреатите // Мистецтво Лікування. — Режим доступа: <http://m-l.com.ua/>.
11. Охлобыстин А.В. Алгоритмы ведения больных острым и хроническим панкреатитом // Русский медицинский журнал. — 1999. — Т. 7, № 6. — С. 296 — 299.
12. Хазанов А.И. Современные проблемы острого и хронического панкреатита // Рос. мед. вестн. — 2001. — Т. 6, № 2. — С. 58 — 63.
13. Биохимическая диагностика хронического рецидивирующего панкреатита (обзор литературы) / Губергриц Н.Б., Штода Л.А., Линевская К.Ю., Череватская Е.Ю. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 8. — С. 3 — 10.
14. Липатов В.А. Лечение и профилактика острого послеоперационного панкреатита. Режим доступа: <http://drli.h1.ru>.
15. Осипова Н.А. Системная фармакотерапия хронического болевого синдрома в онкологии // Современная онкология. — 2003. — Том 5, № 2. — Режим доступа: <http://www.medline.ru>
16. Осипова Н.А., Береснев В.А., Петрова В.В. Мульти-модальная системная фармакотерапия послеоперационного болевого синдрома. — Режим доступа: <http://www.medline.ru/>
17. Analgesic effect of aprotinin the rat and its inhibition by naloxone / Novelli G.P., Pieraccioni E., Peduto V.A., Festimanni F. // Brit. J. Anaest. — 1980. — № 11. — С. 1107-1110.
18. Рудольская Л.И., Лещинский Л.А., Пименов Л.Т. Терапевтическая эффективность каликреин-протеазных ингибиторов в устранении абдоминального синдрома при инфаркте миокарда // Соврем. пробл. диагностики и лечения в гастроэнтерол. клинике: Сб. науч. тр. — Пермь, 1989. — С. 134-138.
19. Nucleorhese a l aprotinine / Vignon E., Bazin T., Conrozier T., Mathieu P., Vochu M. // Rhumatologie. — 1990. — № 1. — С. 1-5.
20. Лечение первичного деформирующего остеоартроза. — Режим доступа: <http://www.medline.ru>
21. Гресь А.А., Вошула В.И. Патогенетическое обоснование применения ингибиторов протеаз при лечении хронического простатита // Мед. новости. — 1997. — № 3. — С. 58-59.
22. Родин А.Ю. Патогенетическое обоснование и клиническая эффективность применения естественных ингибиторов протеаз в терапии псориаза // Вестн. дерматол. и венерол. — 1996. — № 4. — С. 36-38.
23. Исследование состояния эритроцитов у больных эритродермиями в процессе лечения ингибиторами протеолиза / Лезвинская Е.М., Юновидова Л.И., Чилингилов Р.Х., Николаева Е.В. // Рос. журн. кож. и венерич. болезней. — 1998. — № 3. — С. 26-29.
24. Можейко М.Е. Фармакологическая коррекция кининовой системы при системной красной волчанке и системных васкулитах // Некоторые аспекты клинки, диагностики и лечения ревматических болезней. — Куйбышев, 1988. — С. 111-114.

25. Иванец Н.Н. Современная концепция лечения наркоманий. — Режим доступа: <http://www.narcom.ru/cabinet/online/47.html>
26. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В.П., Баркаган Э.С., Гольдберг Е.Д. и др. — Томск, 1980. — 235 с.
27. Фармакологический эффект растительного ингибитора трипсина и контрикала / Кузнецова И.В., Маслова Н.Ф., Любецкая Ж.А. и др. // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Тез. Всероссийск. науч. конф. — С.-Петербург, 1999. — С. 115.
28. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. / Под ред. Ю.Ф. Крылова. — М.: РЛС-2007, 2006. — 1488 с.
29. Лекарственные препараты в России: Справочник Видаль. — М.: «Астра Фарм Сервис», 2007. — 1632 с.
30. Компендиум 2006 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — К.: МОРИОН, 2006. — 2270 с.
31. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Докл. АН СССР. — 1979. — № 5. — С. 1513-1516.

Резюме

Крамаренко О.О.

Порівняльна оцінка фармакологічної дії вітчизняного препарату Апротинін 200000 КІО та препарату Гордокс 100000 КІО

Наведено результати експериментальних досліджень *in vitro* та у дослідгах на тваринах специфічної фармакологічної

активності препарату Апротинін, 200000 КІО, розчин для ін'єкцій, порівняно із референтним препаратом Гордокс, 100000, розчин для ін'єкцій. Не встановлено вірогідно значущих відмінностей у виявленні інгібувочої, відносно трипсину, та антифібринолітичної дії препаратів.

Summary

Kramarenko E.A.

Comparative assessment of pharmacological effect of domestic preparation Aprotinin 200 000 KIE and preparation Gordox 100 000 KIE

Data of experimental studies at tests *in vitro* and at animals of specific pharmacological effect of preparation Aprotinin, 200000 KIE, solution for injections, compared with reference preparation Gordox 100000 KIE, solution for injections, were given. It was not established reliable significant differences in the display of inhibitory effect of preparations versus trypsin and antifibrinolytic effect.

Крамаренко Елена Алексеевна. Ст. науч. сотр. лаборатории биохимической фармакологии ГП ГНЦАС. К.б.н. (2005).

УДК 615.272.3: 615.225

Єсева О.А., Штриголь С.Ю., Мерзлікін С.І.
Національний фармацевтичний університет

Церебропротекторні властивості нового протидіабетичного засобу діакамфу

На щурах із моделлю білатеральної каротидної оклюзії та на мишах із моделлю глобальної гравітаційної церебральної ішемії встановлено виражений захисний ефект нового протидіабетичного засобу діакамфу (25 мг/кг), за яким він перевищує пірацетам і кавінтон. До механізму церебропротекторної дії залучена стимуляція імідазолінових рецепторів. У постішемичному періоді діакамф зменшує неврологічний дефіцит і мнестичні порушення. На моделі нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією діакамф не виявляє дії, на моделі гемічної гіпоксії незначно збільшує тривалість життя тварин, що свідчить про складність механізму його церебропротекторної дії.

Цукровий діабет (ЦД) — актуальна медико-соціальна проблема [1]. Внаслідок ангіопатії у хворих на ЦД частіше, ніж у загальній популяції, розвиваються судинні ускладнення, у т.ч. цереброваскулярні [2, 3]. Гострі порушення мозкового кровообігу (ПМК), що є однією з найчастіших причин інвалідності та смертності [4] при ЦД трапляються у 1.2-1.8 рази частіше, ніж у загальній популяції [5, 6, 7]. Відомі протидіабетичні препарати не виявляють прямої церебропротекторної дії. Діакамф — новий оригінальний лікарський засіб — за хімічною будовою відноситься до похідних бензімідазолу. Препарат зареєстровано в Україні як засіб для лікування ЦД. Фармакологічний ефект його зумовлений гіпоглікемічними, гіполіпідемічними

й антиоксидантними властивостями. Механізм специфічної дії діакамфу реалізується через гальмування метаболічних проявів синдрому інсулінорезистентності [8, 9].

Метою даної роботи є виявлення церебропротекторної дії діакамфу в умовах експериментальних моделей ПМК та гіпоксії.

Матеріали та методи

Дослідження виконано відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2001) на 56 безпородних білих щурах-самцях масою (200-250) г та на 81 безпородних білих мишах-самцях масою (15-20) г. Тварин утримували у стандартних умовах виварію.

У щурів моделювали ПМК за ішемічним типом шляхом перев'язування обох сонних артерій

Таблиця 1

Вплив діакаμφу та пірацетаму на виживаність щурів із моделлю церебральної ішемії (білатеральна каротидна оклюзія)

Термін спостереження	Група, кількість тварин				
	Контрольна патологія (n=20)	Діакаμφ		Ефароксан, 5 мг/кг + діакаμφ, 25 мг/кг (n=8)	Пірацетам, 200 мг/кг (n=8)
		10 мг/кг (n=8)	25 мг/кг (n=12)		
Кількість тварин, що вижили, абс. / %					
1 доба	8/40	2/25	10/83.3*	1/12.5 ^{##}	4/50 [#]
2 доба	8/40	2/25	10/83.3*	1/12.5 ^{##}	4/50 [#]
3 доба	7/35	2/25	10/83.3*	1/12.5 ^{##}	3/37.5 ^{##}
4 доба	6/30	2/25	10/83.3*	1/12.5 ^{##}	3/37.5 ^{##}
5 доба та далі	6/30	2/25	10/83.3*	1/12.5 ^{##}	3/37.5 ^{##}

Примітки:

відмінності достовірні:

* — відносно тварин групи контрольної патології (p<0.01);

— (p<0.05) і ## (p<0.01) — відносно групи тварин, лікованих діакаμφом у дозі 25 мг/кг.

Таблиця 2

Показники виживаності на моделі повної гравітаційної церебральної ішемії у мишей

Кількість тварин, які вижили	Моделльна патологія (n=18)	Кавінтон, 5 мг/кг (n=6)	Пірацетам, 200 мг/кг (n=25)	Діакаμφ, 25 мг/кг (n=8)
абс.	7	3	10	6
%	38.9*	50	40*	75

Примітка.

* — відмінності достовірні відносно групи тварин, лікованих діакаμφом (p<0.05).

Таблиця 3

Показники церебропротекторної дії діакаμφу у мишей

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Діакаμφ, 25 мг/кг
<i>неврологічний статус у постішемичному періоді (тест «Стрижень, що обертається»)</i>			
кількість мишей, які впали зі стрижня, абс./%:	(n=5)	(n=5)	(n=6)
— до 30 с	0/0	2 / 40	0 / 0% ^{##}
— до 1 хв	0/0	2 / 40	0 / 0% ^{##}
— до 5 хв	0/0	3 / 60	0 / 0% ^{##}
— до 10 хв	0 / 0	4 / 80	1 / 16.7% ^{##}
<i>збереженість пам'ятного сліду через 48 год після ішемії (тест УРПУ)</i>			
латентний час входу до темної камери, с	(n=7) 170.0±12.1	(n=5) 154.0±17.0	(n=6) 180.0±0 [#]
кількість мишей, які досягли критерію навченості, абс. / %	5 / 71.4	3 / 60	6 / 100 [#]
<i>стійкість до різних видів гіпоксії (термін виживання, хв)</i>			
нормобарична гіпоксична гіпоксія з гіперкапнією (n=9)	—	18.5±0.67	17.8±0.87
гемічна гіпоксія (n=6)	—	13.8±3.7	16.5±2.8

Примітки:

відмінності достовірні:

— відносно тварин групи інтактного контролю (* — p<0.05, ** — p<0.01);

— відносно тварин групи контрольної патології (# — p<0.05, ## — p<0.01).

[10, 11] під нембуталовим наркозом (40 мг/кг). Діакаμφ вводили у вигляді 0.2% емульсії у шлунок у профілактичному режимі в дозах 10 мг/кг та 25 мг/кг (остання доза виявляє найбільш виражену протидіабетичну дію [9]) протягом 5 діб,

останнє введення проводили за (0.5-1) год до каротидної оклюзії. Як препарат порівняння використовували пірацетам (ЗАТ ФФ «Дарниця») у дозі 200 мг/кг [4] протягом 5 діб. Контрольні тварини одержували відповідний об'єм

розчинника. В окремій серії дослідів щурам вводили специфічний блокатор імідазолінових рецепторів ефароксан («Sigma») у дозі 5 мг/кг внутрішньочеревинно перед введенням діакаамфу, далі відтворювали ПМК і спостерігали за виживаністю тварин. Це дозволяло виявити участь імідазолінових рецепторів у механізмі дії діакаамфу. У мишей моделювали глобальну гравітаційну церебральну ішемію спеціально розробленим способом — центрифугуванням при 6 g у краніо-каудальному векторі протягом 30 с, що викликає відтік крові від голови в усіх судинних басейнах [12]. Діакаамф (25 мг/кг) вводили у шлунок протягом 5 діб до досліду. Препарати порівняння — пірацетам (200 мг/кг) та кавінтон (5 мг/кг) — вводили у такому самому режимі. Церебропротекторну дію оцінювали за виживаністю тварин.

За добу до моделювання гравітаційного ПМК у мишей виробляли умовний рефлекс пасивного уникнення (УРПУ) [10]. Реєстрували латентний період входу до темної камери, де тваринам завдавали електробольове подразнення (0.5 А). Збереженість пам'ятного сліду тестували через 24 год (мишей, що не увійшли до темної камери протягом 180 с, вважали такими, які досягли критерію навченості), далі відтворювали ПМК, що виконувала роль ретроградного амнезуючого фактору. Через (20-30) хв постішемічного періоду оцінювали неврологічний статус тварин, які вижили, за станом м'язового тону та координації руху (тест «Стрижень, що обертається»), через 24 год та 48 год вивчали когнітивний дефіцит за збереженням УРПУ.

Визначали тривалість життя мишей із долями нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапіцією (НГГГ) та гемічної гіпоксії (ГГ). НГГГ моделювали за допомогою гермокамери об'ємом 200 см³, де розміщали тварину, ГГ відтворювали підшкірним введенням 250 мг/кг нітриту натрію [10]. Діакаамф (25 мг/кг) вводили за 30 хв до моделювання гіпоксії.

Результати обробляли статистично за критеріями Фішера та Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

У щурів із білатеральною каротидною оклюзією діакаамф у дозі 10 мг/кг не вплинув на виживаність (Табл. 1). У дозі 25 мг/кг спостерігався виражений захисний ефект: порівняно із контролем виживаність зросла у 2.8 рази, із пірацетамом — у 2.2 рази. Отже, церебропротекторна дія діакаамфу є дозозалежною. Ефароксан усував захисний ефект діакаамфу, що дає підставу вважати стимуляцію імідазолінових рецепторів ланкою механізму дії нового засобу.

На моделі гравітаційної ішемії у групі контрольної патології вижило 40 % мишей (Табл. 2), тоді як на тлі діакаамфу цей показник сягнув 75 % ($p < 0.05$) та залишився незмінним протягом тижня. У групах, де тваринам вводили пірацетам і кавінтон, виживаність складала 40 % та 50 %, відповідно. Таким чином, пірацетам (200 мг/кг) не захищає тварин від гравітаційної ішемії, а кавінтон (5 мг/кг) забезпечує лише тенденцію до збільшення виживаності.

Діакаамф сприяв поліпшенню пам'яті у постішемічному періоді, про що свідчить достовірне збільшення латентного періоду входу до темної камери у порівнянні з контролем у тесті УРПУ. У 100 % мишей, яким вводили діакаамф, зберігся критерій навченості (Табл. 3). Ці результати вказують на ноотропні властивості досліджуваного препарату.

Після ішемії у тварин групи контрольної патології мав місце неврологічний дефіцит у вигляді міорелаксації та порушень координації рухів, що проявлялось зниженням часу утримання на стрижні, що обертається (40 % — до 5 хв і лише 20 % — від 5 хв до 10 хв). Діакаамф усував неврологічний дефіцит: 100 % мишей утримались на стрижні до 5 хв, 83 % — до 10 хв, що відповідає показникам інтактних тварин та вказує на більш сприятливий перебіг реабілітаційного періоду.

На жорсткий та недостатньо специфічний моделі НГГГ діакаамф не змінив тривалості життя тварин. На моделі ГГ він на 19.6 % збільшив цей показник, що достовірно не відрізнявся від контрольного (Табл. 3). Отже, антигіпоксичний ефект не відіграє провідну роль в інтегральній церебропротекторній дії діакаамфу. До її реалізації, поряд зі стимуляцією імідазолінових рецепторів, можуть бути залучені антиоксидантні властивості [5, 8], не можна виключити також цереброваскулярний та антиапоптотичний механізми.

Висновки

Діакаамф виявляє виражену церебропротекторну дію за критеріями збільшення виживаності щурів і мишей, що перенесли різні види ішемії головного мозку, та зменшення неврологічного та когнітивного дефіциту у постішемічному періоді.

До механізму церебропротекторного ефекту залучено збудження імідазолінових рецепторів.

Слабо виражені антигіпоксичні властивості діакаамфу, що виявлені на моделі гемічної гіпоксії, не відіграють провідну роль у розвитку церебропротекторного ефекту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Cockram C.S., Tong P.C.Y. Бремя сахарного диабета 2 типа: эпидемиологическая оценка // Медикография. — 2004. — № 26 (1). — С. 8–18.
2. Areosa, S.A., Grimley E.V. Effect of the treatment of Type II diabetes mellitus on the development of cognitive Kungsholmen project // American Journal of Epidemiology. — 2002. — Vol. 155. — P. 1081–1087.
3. Risk factors for cerebrovascular disease as correlates of cognitive function in a stroke free cohort / Desmond D.W., Tatemichi T.K., Paik M. et al. // Archives of Neurology. — 1993. — Vol. 50. — P. 162–166.
4. Профілактика і лічення інсульту. Рекомендації Європейської ініціативної групи по проблемі інсульту / Хаке В., Касте М., Богуславски Д. и др. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт (приложение к журналу). — 2001. — Вып. 4. — С. 3-9.
5. Галиева О.Р., Джанашия П.Х., Мирина Е.Ю. Лечение диабетической нейропатии // Междунар. неврологический журнал. — 2008. — №1 (17) — С. 77-81.
6. Особливості перебігу цереброваскулярних порушень у хворих на цукровий діабет 2-го типу / Міщенко Т.С., Божко Г.Х., Харіна К.В., Балкова Н.Б. // Укр. вісник психоневрології. — 2007. — Т. 15. - Вип. 1. — С. 88.
7. Клінічні особливості перебігу гострих порушень мозкового кровообігу у хворих з метаболічним синдромом / Насонова Т.І., Весельский В.Л., Крилова В.Ю., Горева Г.В. // Международный неврологический журнал. — 2008. — №1 (17). — С. 51-53.
8. Бонднар П.М., Мерзлікін С.І., Кононенко Л.О. Клінічне випробування цукрознижуючої та антиоксидантної дії діакамфу — нового фармакологічного засобу // Клінічна фармація — 2001. — №3 (5). — С. 46-48.
9. Мерзлікін С.І. Розробка і стандартизація оригінального антидіабетичного засобу на основі (\pm)-дис-3-(2'-бензімідазоліл)-1,2,2-триметилциклопентанкарбонової кислоти: Автореф. дис. ... д.фарм.н. — Х., 2004. — 36 с.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИА «Ремедиум», 2000. — 398 с.
11. Штрыголь С.Ю. Модуляция фармакологических эффектов при различных солевых режимах. — Х.: Ависта-ВАТ, 2007. — 360 с.
12. Экспериментальні моделі церебральної ішемії у мишей: порівняльна характеристика гравітаційного перевантаження та каротидної оклюзії / Штрыголь С.Ю., Штрыголь В.С., Єсєва О.А., Тіманюк В.О. // Клінічна фармація. — 2008. — № 2. — С. 39-43.

Резюме

Єсєва О.А., Штрыголь С.Ю., Мерзлікін С.І.

Церебропротекторные свойства нового противодиабетического средства диакамфа

На крысах с моделью билатеральной каротидной окклюзии и мышях с моделью глобальной гравитационной церебральной ишемии установлен выраженный защитный эффект противодиабетического средства диакамфа (25 мг/кг), по которому он превосходит пирасетам и кавинтон. В механизм церебропротекторного действия вовлечена стимуляция имидазолиновых рецепторов. В постгемическом периоде диакамф уменьшает неврологический дефицит и мнестические нарушения. На модели нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией диакамф не оказывает действия, а на модели гипоксической гипоксии незначительно увеличивает продолжительность жизни животных, что свидетельствует о сложности механизма его церебропротекторного действия.

Summary

Yeseva O.A., Shtrygol S.Yu., Merzlikin S.I.

Cerebroprotective characters of new antidiabetic drug Diacamph

At rats with the model of bilateral carotid occlusion and at mice with the model of global gravity cerebral ischemia expressed protective effect of new antidiabetic drug Diacamph (25 mg/kg) was determined. According to this effect, it exceeded pyracetam and cavinton. To the mechanism of cerebroprotective effect the stimulation of imidazoline receptors was involved. At postischemic period Diacamph decreased neurological deficit and mnesia abnormalities. At the model of normobaric hypoxic hypoxia with the hypercapnia Diacamph did not have an effect, at the model of hemic hypoxia insignificantly increase animals' life time, which testify to the complexity of the mechanism of its cerebroprotective effect.

Єсєва Ольга Андріївна. Клінічний провізор. Аспірант кафедри технології ліків із клінічною фармакологією та фармацевтичною опікою Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Штрыголь Сергій Юрійович. Д.мед.н. Професор кафедри технології ліків із клінічною фармакологією та фармацевтичною опікою інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Мерзлікін Сергій Іванович. Д.фарм.н. Професор кафедри токсикологічної хімії НФаУ.

Соколюк Т.В., Горбенко Н.І., Подгайний Д.Г., Мерзлікін С.І.
Національний фармацевтичний університет
Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського

Дослідження антигіперглікемічних та антиатерогенних властивостей діакамфу на кролях за умов експериментального цукрового діабету 2 типу

Наведено результати дослідження антигіперглікемічних та антиатерогенних властивостей діакамфу на кролях за умов експериментального цукрового діабету 2 типу. Встановлено, що тривале (протягом 2 місяців) уведення діабетичним кролям діакамфу сприяє досягненню у них стійкого глікемічного контролю, що корелює з відновленням показників коефіцієнта функції бета-клітин, інсулінемії та зниженням атерогенного індексу до рівнів відповідних показників інтактного контролю. Показано, що діакамф у порівнянні з метформіном у вдвічі нижчій дозі має певні переваги за встановленими властивостями.

Передчасний атеросклероз є основною причиною інвалідазації та смертності, обумовлених макросудинною патологією у хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу. Ранній прояв і швидке прогресування атерогенних процесів за умов ЦД 2 типу тісно корелює з високою частотою інфаркту міокарда, захворювань периферичних судин та інсульту [8].

Оскільки основною метою терапії ЦД є збільшення тривалості та збереження якості життя пацієнтів, фармакологічне втручання має бути направлене не тільки на зниження гіперглікемії, але і на більш ефективний захист серцево-судинної системи.

Антигіперглікемічний препарат метформін, який використовується вже понад 40 років і в даний час є пероральним антидіабетичним засобом, що найчастіше призначається, виявляє також здатність зменшувати число інфарктів міокарда і смертність у хворих на ЦД 2 типу з ожирінням. У той же час найбільш серйозним ускладненням бігуанідної терапії залишається лактоцидоз і гострі побічні ефекти з боку шлунково-кишкового тракту, що дещо обмежує широке клінічне застосування метформіну, особливо у осіб похилого віку з нирковою недостатністю [10].

Антидіабетичний засіб діакамф виявляє цукрознижуючу й антиоксидантну дію, має низьку токсичність і призначений для лікування ЦД 2 типу [2-4]. Даний препарат розроблено в Національному фармацевтичному університеті (Реєстраційне посвідчення на активну субстанцію №UA3130/01/01). Разом із тим, ще не всі антидіабетичні властивості діакамфу достатньо вивчено.

Метою даної роботи є дослідження антигіперглікемічних та антиатерогенних властивостей діакамфу на кролях за умов експериментального ЦД 2 типу.

Матеріали та методи

Визначення впливу досліджуваних препаратів на глюкозний гомеостаз і ліпідний профіль

проводили на самцях кролів породи «Шинши-ла» із ЦД 2 типу, що індукували внутрішньочеревним уведенням дитизону в дозі 35 мг/кг маси тіла [9].

Діакамф вводили діабетичним кролям перорально щоденно в дозі 25 мг/кг маси тіла протягом 2 місяців. Як препарат порівняння використовували метформін у дозі 50 мг/кг маси тіла за аналогічною схемою.

Стан глюкозного гомеостазу оцінювали кожний місяць за динамікою базальної глікемії, а також за показниками інсулінемії, концентрації фруктозаміну [7] у сироватці крові кролів та внутрішньовенного тесту толерантності до глюкози (ВВТТГ), 50 мг/кг маси тіла. Базальну інсулінемію визначали радіоімунологічним методом «подвійних антитіл» за допомогою наборів «рио-ИНС-ПГ-¹²⁵I». Площу під глікемічними кривими (ПГК) при проведенні ВВТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми «Mathlab». Коефіцієнт функції бета-клітин (ФБК) розраховували за допомогою алгоритму «НОМА» (Homeostatic Model Assessment) [6]. Концентрацію холестерину ліпопротеїнів високої густини (ХС-ЛПВГ) визначали ферментативним методом за допомогою стандартних наборів фірми «Boeringer-Mannheim Gmb diagnostica» (Німеччина). Холестерин ліпопротеїнів низької густини (ХС-ЛПНГ) та атерогенний індекс розраховували за відповідними формулами Friedewald W.T. [5] та [1].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведеного експерименту встановлено (Табл. 1), що у діабетичних кролів, яким вводили плацебо, через 2 місяці після індукції діабету зберігалася істотне підвищення базальної глікемії у порівнянні з інтактним контролем, тоді як застосування досліджуваних препаратів експериментальним тваринам вже через місяць призводить до достовірного зниження у них гіперглікемії.

У той же час, більш тривале (протягом 2 місяців) застосування діакамфу, на відміну від застосування метформіну, сприяло досягненню у діабетичних тварин стійкого глікемічного контролю. Підтвердженням ослаблення інсулінової недостатності у кролів із діабетом, що одержували діакамф, було відновлення до рівня інтактного контролю зниженого більш ніж у 200 разів коефіцієнта ФБК і зниження рівня фруктозаміну, що відображає стан глікемічного контролю в експериментальних тварин за останні два тижні (Табл. 2). Слід зазначити, що в експериментальних тварин, яким вводили діакамф, не зареєстровано розвитку гіпоглікемічних станів.

Аналіз ліпідного профілю діабетичних кролів контрольної групи, які одержували плацебо, проведений через 2 місяці після індукції ді-

абету, дозволив констатувати у них наявність атерогенних змін, характерних для діабетичної дисліпідемії (Табл. 3). При цьому вміст атерогенної фракції ХС-ЛПНГ у сироватці крові діабетичних кролів був істотно вищим, а вміст ХС-ЛПВГ — значно нижчим у порівнянні з показниками в інтактній групі тварин, що сприяло триразовому збільшенню атерогенного індексу. Уведення діабетичним кролям діакамфу сприяло підвищенню концентрації ХС-ЛПВГ у сироватці крові діабетичних кролів та зниженню вмісту атерогенної фракції ХС-ЛПНГ, що дозволило знизити показник атерогенного індексу у 2.3 рази відносно контрольної групи та у 1.6 рази відносно тварин, які одержували метформін.

Одержані результати досліджень свідчать про певні переваги діакамфу (терапевтична доза

Таблиця 1

Динаміка базальної глікемії у кролів із дитизоновим діабетом, які отримували діакамф протягом двох місяців (n=5, X±S_x)

Група тварин, доза	Базальна глікемія, ммоль/л		
	вихідний рівень	через 1 місяць	через 2 місяці
інтактний контроль	4.54±0.16	4.62±0.17	4.39±0.21
діабет + плацебо	14.31±1.57 p ₁ <0.001	13.68±1.29 p ₁ <0.001	16.13±2.56 p ₁ <0.001
діабет + метформін (50 мг/кг)	14.78±1.57 p ₁ <0.001 p ₂ >0.05	9.09±0.84 p ₁ <0.001 p ₂ <0.02	8.56±1.99 p ₁ <0.05 p ₂ <0.05
діабет + діакамф (25 мг/кг)	14.38±1.22 p ₂ >0.05 p ₃ >0.05	9.99±1.04 P ₂ >0.05 P ₃ >0.05	3.30±0.03 p ₂ <0.001 p ₃ <0.05

Примітки:

p₁ — вірогідність змін порівняно із групою «інтактний контроль»;

p₂ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + плацебо»;

p₃ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + метформін».

Таблиця 2

Показники глюкозного гомеостазу у кролів із дитизоновим діабетом, які отримували діакамф протягом двох місяців, (n=5, X±S_x)

Група тварин, доза	Базальна глікемія, ммоль/л	Базальна інсулінемія, ммоль/л	Коефіцієнт ФБК	ПГК, ммоль/л/хв	Концентрація фруктозаміну, ммоль/л
інтактний контроль	4.54±0.16	182.4±18.3	543.86±82.87	281.8±13.5	4.44±0.13
діабет + плацебо	16.13±2.56 p ₁ <0.02	92.8±4.6 p ₁ <0.01	22.76±5.26 p ₁ <0.001	1051.3±115.4 p ₁ <0.001	6.87±0.45 p ₁ <0.001
діабет + метформін (50 мг/кг)	8.56±1.99 p ₁ <0.05 p ₂ <0.05	121.1±19.5 p ₁ <0.05 p ₂ >0.05	80.47±12.23 p ₁ <0.001 p ₂ <0.01	528.6±35.6 p ₁ <0.02 p ₂ <0.05	4.10±0.28 p ₁ >0.05 p ₂ <0.001
діабет + діакамф (25 мг/кг)	3.30±0.03 p ₃ <0.05	168.5±18.1 p ₃ >0.05	599.10±72.3 p ₃ <0.001	295.1±31.6 p ₃ <0.01	4.85±0.38 p ₃ >0.05

Примітки:

p₁ — вірогідність змін порівняно із групою «інтактний контроль»;

p₂ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + плацебо»;

p₃ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + метформін».

Таблиця 3

Атрогенний індекс та показники різних фракцій холестерину у сироватці крові кролів із дитизоновим діабетом, які отримували діакамп протягом двох місяців, (n=5, X±S_x)

Група тварин, доза	ХС-ЛПВГ, ммоль/л	ХС-ЛПНГ, ммоль/л	Атерогенний індекс
інтактний контроль	0.61±0.02	1.97±0.12	3.12±0.11
діабет + плацебо	0.30±0.02 p ₁ <0.001	3.04±0.15 p ₁ <0.001	10.13±0.91 p ₁ <0.001
діабет + метформін (50 мг/кг)	0.41±0.04 p ₁ <0.05 p ₂ <0.05	2.89±0.18 p ₁ <0.01 p ₂ >0.05	6.88±0.44 p ₁ <0.001 p ₂ <0.01
діабет + діакамп (25 мг/кг)	0.49±0.04 p ₂ <0.001 p ₃ >0.05	2.13±0.13 p ₂ <0.001 p ₃ <0.02	4.28±0.52 p ₂ <0.001 p ₃ <0.02

Примітки:

p₁ — вірогідність змін порівняно із групою «інтактний контроль»;

p₂ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + плацебо»;

p₃ — вірогідність змін порівняно із групою «діабет + метформін».

25 мг/кг маси тіла тварини) за антигіперглікемічними та антиатерогенними властивостями перед метформіном, застосованого у терапевтичній дозі 50 мг/кг маси тіла, в умовах хронічного уведення діабетичним тваринам.

Висновки

Встановлено, що тривале (протягом 2 місяців) уведення діабетичним кролям діакамбу сприяє досягненню у них стійкого глікемічного контролю без ризику виникнення гіпоглікемічних станів.

Виявлено антиатерогенні властивості діакамбу за умов експериментального ЦД 2 типу. Удвічі більш низька терапевтична доза діакамбу у порівнянні з метформіном забезпечує досягнення більш вираженого фармакологічного ефекту.

ЛІТЕРАТУРА

- Герасимова Е.Н. Дисліпопротеїдемія і гормони в плазмі крові чоловіків 40–59 років // Дисліпопротеїдемія і ішемічна хвороба серця. — М.: Медицина, 1980. — С. 83–102.
- Діакамп — оригінальний антидіабетичний засіб для фармакотерапії інсулінонезалежного цукрового діабету / Мерзлікін С.І., Черних В.П., Болотов В.В. та ін. // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: Матер. VI Національного з'їзду фармацевтів України (28-30 вересня 2005 р., м. Харків). — Х.: Вид-во НФаУ, 2005. — С. 443.
- Патент 2205826 РФ, МКІ С 07 Д 235/16. (±)-Цис-3-(2'-бензимидазолил)-1,2,2-триметилоклопентанкарбонова кислота, проявляющая сахароснижающее и антидиабетогенное действие / С.И. Мерзликін, В.П. Черных, В.В. Болотов та ін. (Україна): Заявл. 21.12.00; Опубл. 10.06.03. — Бюл. №16.
- Стандартизація одержання субстанції діакамбу — нового антидіабетичного лікарського засобу / С.І. Мерзлікін, В.П. Черних, Ф.Г. Яременко та ін. // Створення, виробництво, стандартизація, фармакоэкономика лікарських засобів та біологічно-активних добавок. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. — Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. — С. 293-295.

- Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of The concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge // Clin. Chem. — 1972. — Vol. 18, № 6. — P. 499–502.
- Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski et al. // Diabetologia. - 1985. - Vol. 28. - P. 412-419.
- Johnson R.N., Metcalf P.A., Baker J.R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control // Clin. chim. Acta. — 1982. — Vol. 127. — P. 87-95.
- Marso S.P. The pathogenesis of type 2 diabetes and cardiovascular disease // Br. J. Diabetes Vasc. Dis. - 2002. — Vol. 2. — P. 350-356.
- Okamoto H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes // Molec. cell. Biochem. - 1981. - Vol. 3. - P. 43-61.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) // Lancet. — 1998. — Vol. 352, № 9131. — P. 854-865.

Резюме

Соколюк Т.В., Горбенко Н.И., Подгайный Д.Г., Мерзликін С.И.

Исследование антигипергликемических и антиатерогенных свойств диакампа на кролях в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа

Представлены результаты исследований антигипергликемических и антиатерогенных свойств диакампа на кролях в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа. Установлено, что длительное (в течение 2 месяцев) введение диабетическим кролям диакампа способствует достижению у них стойкого гликемического контроля, что коррелирует с восстановлением показателей коэффициента функции бета-клеток, инсулинемии и снижением атерогенного индекса до уровней соответствующих показателей интактного контроля. Показано, что диакамп по сравнению с метформином в вдвое более низкой дозе имеет преимущества по установленным свойствам.

Summary

Sokoluk T.V., Gorbenko N.I., Podgaynyy D.G., Merzlikin S.I.

Study of antihyperglycemic and antiatherogenic effects of diacamp in rabbits under conditions of experimental type II diabetes

It was given data of studies of antihyperglycemic and antiatherogenic effects of diacamp in rabbits under condi-

tions of experimental type II diabetes were given. It was established that continuous (for 2 months) introduction in diabetic rabbits of diacamph conducted to obtaining of persistent glyceemic control. It correlated with the renewal of indices of factor of the function of beta cells, insulinemia and decrease of atherogenic index to levels of conformable indices of intact control. It was shown that diacamph in comparison with methformin in twice more low dose had advantages according established effects.

Соколюк Тетяна Володимирівна. Асистент кафедри технології ліків і клінічної фармакології з фармацевтичною опікою Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету.

Горбенко Наталія Іванівна. Д.б.н. Зав. відділом фармакології та токсикології Інституту проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського.

Подгайний Дмитро Григорович. Аспірант кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету.

Мерзлікін Сергій Іванович. Д. фарм. н. Професор кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету.

УДК 616.61'153.49-008.64-085:547.814.5

Харченко Д.С., Зупанець І.А., Шебеко С.К.
Національний фармацевтичний університет

Дослідження впливу кверцетину при парентеральному введенні на біохімічні показники щурів із нирковою недостатністю на тлі хронічного гломерулонефриту

Проведено дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на біохімічні показники щурів із нирковою недостатністю на тлі хронічного гломерулонефриту. Встановлено, що під впливом кверцетину відбувалось збільшення рівня загального білка та альбуміну крові, а також зменшення рівня ТБК-чутливих речовин та дієвих коп'югатів у сироватці крові та гомогенаті нирок щурів. Проведені дослідження свідчать про позитивний вплив парентеральної форми кверцетину на азотистий обмін у щурів: під впливом кверцетину у щурів зменшувався рівень креатиніну та сечовини крові та зростав кліренс сечовини.

Останнім часом питання діагностики та лікування хронічної ниркової недостатності (ХНН) набувають дедалі більшої актуальності, що пов'язано зі значною частотою виникнення даної патології, складністю її перебігу, високою летальністю та неблагополучними прогнозами. За даними літератури за останні 2 роки на 1 млн населення трапляється 173 випадки ниркової недостатності, особливо у гострій стадії процесу, а у віці старіше 65 років — 500 випадків гострої ниркової недостатності. Ниркова недостатність є причиною госпіталізації до 23 % пацієнтів нефрологічного профілю [7, 19, 20].

Хоча у клінічній практиці для лікування ниркової недостатності широко застосовують різноманітні методи та лікарські препарати, проблема розробки та використання нових лікарських засобів і методів лікування займає значне місце в експериментальній і клінічній нефрології.

Швидко прогресування ниркової недостатності, послаблення адаптаційних резервів організму, значне збільшення навантаження лікарськими препаратами постійно потребує від клініцистів пошуку найбільш фізіологічних, комплексно діючих засобів, що викликають найменшу кількість побічних реакцій [2, 4, 13].

Із огляду на вищезазначене, великий інтерес для лікування ниркової недостатності викликають біофлавоноїди, зокрема кверцетин, що, завдяки особливостям своєї фармакодинаміки, може чинити позитивний вплив на азотистий обмін пацієнтів із ХНН [10, 21]. Кверцетин виявляє протизапальні, антиоксидантні, капіляророзміцнюючі, цитопротекторні, антисклеротичні та інші властивості, що є необхідними для профілактики та лікування захворювань нирок [6, 17, 18, 22].

Метою даної роботи було дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на динаміку біохімічних показників щурів із нирковою недостатністю на тлі аутоімунного гломерулонефриту.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей парентеральної форми кверцетину в умовах розвитку ниркової недостатності на тлі аутоімунного гломерулонефриту було проведено на 70 білих нелінійних щурах-самцях, із яких 40 тварин використовувались як піддослідні, а 30 тварин — для отримання ниркового антигену.

Як об'єкт дослідження було використано препарат «Корвітин» (Борщагівський ХФЗ, Укра-

їна) у парентеральній формі. Усі тварини були розділені на 4 групи, по 10 тварин у кожній:

1 група — інтактний контроль;

2 група — контрольна патологія;

3 група — тварини з патологією, що отримували кверцетин у дозі 33.8 мг/кг (ЕД, визначена нами у попередніх дослідженнях у щурів на тлі ХНН);

4 група — тварини з патологією, що отримували референт-препарат Леспенефрил у дозі 1.2 мл/кг, що відповідає СТА для людини з урахуванням коефіцієнтів видової чутливості.

Гломерулонефрит у щурів відтворювали за методом Neumann W. [16] у модифікації (Вихерт А.М. с соавт.) [3]. Імунізацію тварин проводили за допомогою 20 % емульсії коркового шару нирок у сполученні з повним ад'ювантом Фрейнда («Sigma», США) у співвідношенні 1:1. Через 4 тижні, коли з'являлись перші клінічні ознаки захворювання, із метою потенціювання аутоімунного процесу, введення імунізуючої суміші повторювали в тій самій дозі, яку вводили внутрішньочеревинно [1]. Через 7-8 тижнів після повторної імунізації клінічна картина захворювання набувала розгорнутого характеру.

Тварини дослідних груп починаючи від 90 доби експерименту отримували препарати 1 раз на добу протягом 30 діб: щурам групи 3 внутрішньочеревинно вводили кверцетин у дозі 33.8 мг/кг у необхідній кількості фізіологічного розчину, тваринам групи 4 внутрішньошлунково вводили Леспенефрил, розчинюючи його у такій самій кількості фізіологічного розчину. Тварини інтактною та контрольною груп внутрішньочеревинно отримували фізіологічний розчин в еквівалентній кількості.

Для контролю за розвитком патології на 30 добу, 60 добу та 90 добу експерименту у тварин визначали добовий та відносний діурез, вміст білка у сечі та досліджували сечовий осад.

Для визначення ступеня патологічних змін в організмі на 120 добу експерименту у щурів визначали добовий діурез, після чого їх виводили з експерименту із метою отримання сироватки крові та тканини нирок для біохімічних досліджень.

Біохімічні дослідження проводили за допомогою біохімічних наборів «Lachema» (Чехія) такими методами: сечовину крові та сечі визначали діацетилмонооксимним методом [5]; креатинін крові та сечі — за реакцією з пікріновою кислотою [9]; загальний білок крові — біуретовим методом [5]; альбумін крові — за реакцією з бромкрезоловим зеленим [5]. Вміст ТБК-чутливих речовин і дієнових кон'югатів

(ДК) у крові та тканині нирок визначали за допомогою стандартних спектрофотометричних методик [14, 15]. Кліренс сечовини (C_{ur}) обчислювали за формулою:

$$\frac{U_{ur} \times V}{P_{ur}},$$

де:

U_{ur} — концентрація сечовини у сечі;

P_{ur} — концентрація сечовини у плазмі крові;

V — добовий об'єм сечі.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента та непараметричних методів аналізу [8, 11, 12].

Результати досліджень та їх обговорення

Протягом дослідження у тварин із нирковою недостатністю та гломерулонефритом вивчали біохімічні показники крові та ниркової тканини, деякі з яких наведено в Табл. 1. Звертає на себе увагу те, що у групі з контрольною патологією рівень загального білка був вірогідно нижче ніж у інтактних тварин протягом усього дослідження: було відмічено зниження у 2.3 рази. При цьому рівень альбумінів був вірогідно нижчим за інтакт, але ця різниця нівелювалась, що частково вказує на неселективний характер протеїнурії. Рівень загального білка був також дуже низьким у групі 4, де використовували референт-препарат. На відміну від цього, у групі 3 показник загального білка протягом усього дослідження був вірогідно вищим ніж у групі тварин із контрольною патологією та вірогідно перевищував рівень у тварин, які отримували препарат порівняння, при тому що рівень альбуміну крові у цій групі тварин також був вірогідно вищим ніж у контрольній групі, що частково може вказувати на більш селективний характер протеїнурії ніж у щурів із контрольною патологією.

Невід'ємною частиною запально-деструктивних процесів у нирках є посилення процесів вільнорадикального окиснення, тому протягом експерименту було визначено динаміку вмісту ТБК-чутливих речовин та ДК у сироватці крові та гомогенаті нирок, як інтегративних і досить інформативних показників процесів переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Табл. 1). Так, у групі контрольної патології було відмічено вірогідне підвищення у 2 рази вмісту ТБК-чутливих речовин та ДК у сироватці крові протягом всього експерименту у порівнянні з інтактними тваринами. Саме така тенденція ще була відмічена у групі 4, де тварини отримували лікування Лес-

пенефрилом. На відміну від цього, під впливом кверцетину розглянуті показники знижувались у середньому в 1.5 рази у порівнянні з контрольною патологією і були не тільки вірогідно нижчими за показники тварин цієї групи, але й ще за показники щурів, які отримували препарат порівняння Леспенефрил.

Аналогічна картина спостерігалась при аналізі динаміки вмісту ТБК-чутливих речовин та ДК у гомогенаті нирок дослідних тварин. У групі 3 вміст ТБК-чутливих речовин та ДК у тканині нирок був вірогідно нижчим приблизно у 2 рази ніж у тварин із контрольною патологією, а також ніж у тварин, які отримували препарат порівняння Леспенефрил.

Певна динаміка змін мала місце у показниках азотистого обміну (Табл. 2). Так, у групі з контрольною патологією було відмічено стійке підвищення рівня сечовини крові, що на 120 добу досліду досягло 5.4 разів у порівнянні з інтактними щурами. У всіх інших дослідних групах цей показник був вірогідно нижчим за

тварин групи 2. Майже така саме тенденція спостерігалась при аналізі вмісту креатиніну у сироватці крові експериментальних тварин, за тим виключенням, що у групі 3 показник креатиніну крові був вірогідно нижчим не тільки за тварин із контрольною патологією, але й у тих, які отримували препарат порівняння Леспенефрил. При цьому у тварин із гломерулонефритом і нирковою недостатністю відбувалось зниження кліренсу сечовини, що на 120 добу експерименту досягло 4.3 разів у порівнянні з інтактними тваринами. При використанні кверцетину показник кліренсу сечовини мав тенденцію до нормалізації і був вірогідно вищим ніж у тварин із контрольною патологією. При цьому даний показник знаходився на рівні, нижчому ніж у інтактних тварин лише в 1.3 рази. При використанні Леспенефрилу кліренс сечовини також зростав у порівнянні з контрольною патологією, але він був нижчим, хоча і не вірогідно, ніж у тварин, що отримували кверцетин.

Таблиця 1

Біохімічні показники щурів із гломерулонефритом і нирковою недостатністю під впливом експериментальної терапії (n=40)

Група тварин	Загальний білок, г/л	Альбумін, %	ТБК-чутливі продукти крові, мкмоль/л	ТБК-чутливі продукти нирок, мкмоль/г	ДК крові, мкмоль/л	ДК нирок, мкмоль/г
1 група (інтактний контроль)	72.16±2.2	33.09±0.87	2.90±0.27	42.82±3.78	56.65±5.09	3.82±0.33
2 група (контрольна патологія)	31.50±2.38*	24.48±2.05*	6.11±0.61*	97.52±11.73*	111.21±11.36*	9.36±0.97*
3 група (кверцетин)	54.02±4.15**	31.98±0.99**/·	3.78±0.24**/·	50.73±4.46**/·	72.70±5.08**/·	5.57±0.46**/·
4 група (Леспенефрил)	41.16±4.47*	27.89±1.27*	5.47±0.43*	66.94±5.64**	93.52±7.87*	7.67±0.42*

Примітки:

- * — відхилення вірогідні відносно інтактних тварин (p ≤ 0.05);
- ** — відхилення вірогідні відносно тварин групи контрольної патології (p ≤ 0.05);
- — відхилення вірогідні відносно тварин, що отримували препарат порівняння Леспенефрил (p ≤ 0.05).

Таблиця 2

Показники азотистого обміну щурів із гломерулонефритом і нирковою недостатністю під впливом експериментальної терапії (n=40)

Група тварин	Креатинін крові, мкмоль/л	Сечовина крові, ммоль/л	Кліренс сечовини, мл/доба
1 група (інтактний контроль)	50.36±3.11	4.32±0.26	179.4±18.7
2 група (контрольна патологія)	120.16±9.54*	23.15±2.59*	42.2±3.3*
3 група (кверцетин)	81.49±8.54**	10.82±0.93**	138.0±13.4**
4 група (Леспенефрил)	90.58±9.46	13.28±1.02**	127.5±16.9**

Примітки:

- * — відхилення вірогідні відносно тварин інтактною групи (p ≤ 0.05);
- ** — відхилення вірогідні відносно тварин групи контрольної патології (p ≤ 0.05).

Таким чином, при використанні парентеральної форми кверцетину для лікування лабораторних тварин із нирковою недостатністю на тлі гломерулонефриту відбувається нормалізація показників біохімічного аналізу крові та азотистого обміну, що обумовлює значний загальний позитивний вплив препарату на перебіг захворювання.

Висновки

В умовах розвитку у щурів хронічної ниркової недостатності на тлі аутоімунного гломерулонефриту при застосуванні кверцетину у парентеральній формі відбувається нормалізація показників біохімічного аналізу крові та азотистого обміну, що обумовлює загальний позитивний вплив препарату на перебіг захворювання.

За впливом на біохімічні показники крові та показники азотистого обміну парентеральна форма кверцетину не поступається, а за деякими показниками навіть перевищує референс-препарат Леспенефрил.

ЛІТЕРАТУРА

1. Быковская Н.К. Экспериментальный аутоиммунный гломерулонефрит у крыс и его лечение преднизолоном: Автореф. дис. ... к.б.н. - Москва, 1968. - 14 с.
2. Васильченко Е. А. Фитопрепараты для нефрологии: разработки ГНЦАС и современные аспекты фармакотерапии заболеваний почек // Фармаком. — 1999. — № 3-4. — С. 78-86.
3. Вихерт А.М., Соколова И.Р., Быковская Н.К. Экспериментальная модель аутоиммунного гломерулонефрита // Архив патологии. — 1973. — Т. 35, № 11. — С. 15-21.
4. Дудар І., Величко М. Ренопротекція: реальні можливості сьогодні // Ліки України. — 2004. — № 9. — С. 18-24.
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. — 2-е изд. — Мн.: Интерпрессервис, 2003. - Т. 1. — 495 с.
6. Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Украинский медицинский альманах. — 1999. — Т. 2, № 4. — С. 176-182.
7. Кучма І.Л. Хронічна хвороба нирок: що нам необхідно робити сьогодні? // Therapia. — 2006. — № 6. — С. 25-29.
8. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
9. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Пер. с англ. — СПб.: БИНОМ, 2000. — 368 с.
10. Оспанова Т.С., Семидоцька Ж.Д., Халанський О.А. Флавоноїдні препарати у патогенетичній терапії хронічного гломерулонефриту // Ліки. — 1996. — № 5-6. — С. 19-26.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — 3-е изд. — М.: МедиаСфера, 2006. — 312 с.
12. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 304 с.
13. Современные подходы к замедлению прогрессирования хронической болезни почек / Смирнов А.В., Каюков И.Г., Есаян А.М. и др. // Нефрология. — 2004. — Т. 8, № 3. — С. 89-99.
14. Стальная И.Д., Гаришвили Г.Т. Определение диеновых конъюгатов // Современные методы в биохимии / Под ред. Ореховича. — М., 1977. - С. 43-44.
15. Стальная И.Д., Гаришвили Г.Т. Определение малонового диальдегида // Там же. - С. 44-47.
16. Alousi M.A., Heymann W. Experimental autoimmune nephrosis in rats // Am. J. Pathol. — 1969. — Vol. 54, №1. — P. 47-71.
17. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension / Garcia-Saura M. F., Galisteo M., Villar I. C. et al. // Molecular And Cellular Biochemistry. — 2005. — Vol. 270, № 1-2. — P. 147-155.
18. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties / Morales A. I., Vicente-Sanchez C., Sandoval J. M. et al. // Food and Chemical Toxicology. — 2006. — Vol 44, № 12. — P. 2092-2100.
19. National Kidney Foundation. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Executive Summary. — N.Y., 2002. — 94 p.
20. Schieppfti A., Perico N., Remuzzi G. Preventing end-stage renal disease: the potential impact of screening and intervention in developing countries // Nephrol. Dial. Transplant. — 2003. — Vol. 18, № 5. — P. 858-859.
21. Shoskes D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents // Transplantation. — 1998. — Vol. 66, № 2. — P. 147-152.
22. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats / Singh D., Chander V., Chopra K. et al. // Archives Of Medical Research. — 2004. — Vol. 35, № 6. — P. 484-494.

Резюме

Харченко Д.С., Зупанец І.А., Шебеко С.К.

Изучение влияния кверцетина при парентеральном введении на биохимические показатели крыс с почечной недостаточностью на фоне хронического гломерулонефрита

Проведено изучение влияния парентеральной формы кверцетина на биохимические показатели крыс с почечной недостаточностью на фоне хронического гломерулонефрита. Установлено, что под влиянием кверцетина отмечалось повышение уровня общего белка и альбумина крови, а также снижение уровня ТБК-чувствительных веществ и диеновых конъюгатов в сыворотке крови и гомогенате почек крыс. Проведенные исследования свидетельствуют о положительном влиянии кверцетина на азотистый обмен у крыс: под действием кверцетина у крыс уменьшался уровень креатинина и мочевины крови и увеличивался клиренс мочевины.

Summary

Kharchenko D.S., Zupanets I.A., Shebeko S.K.

Study of an impact of quercetin at parenteral introduction on biochemical indices of rats with renal insufficiency against the background of chronic glomerulonephritis

A study of an impact of parenteral form of quercetin on biochemical indices of rats with renal insufficiency against the background of chronic glomerulonephritis was conducted. It was established that under the effect of quercetin had been registered a rise of the level of crude protein and albumin of blood, and also decrease of the level of TBA-sensitive substances and DC in the serum and homogenate of rat's kidney. Conducted studies showed positive effect of quercetin on nitrogen metabolism of rats: under quercetin effect decreased the level of kreatine and blood urea and increased the urea clearance.

Зупанец Ігор Альбертович. Д.,мед.н. Професор. Зав. кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою НФаУ.

Шебеко Сергій Костянтинович. К.фарм.н. Доцент кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою НФаУ.

Харченко Дмитро Сергійович. Аспірант кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою НФаУ.

УДК 615.212: 615.276:547.857.4

Корниенко В.И., Самура Б.А., Литаров В.Е.
Харьковская государственная зооветеринарная академия
Национальный фармацевтический университет

Исследование антиноцицептивной и антифлогистической активности аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты

Проведены скрининговые исследования аммонийных солей замещенных имидазо-[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты и показано их влияние на течение воспалительного процесса и чувствительность висцеральных ноцицепторов. В результате экспериментального исследования анальгетической активности выявлено соединение, обладающее обезболивающим действием, сопоставимым с действием диклофенака. При исследовании противовоспалительной активности это соединение оказывало выраженное антиэкссудативное действие, не уступающее диклофенаку. Аммонийные соли замещенных имидазо-[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты являются перспективной группой для дальнейшего проведения синтеза и фармакологического скрининга с целью создания веществ, обладающих анальгетическими и противовоспалительными свойствами.

Для облегчения боли, уменьшения явлений воспаления, лечения простудных и лихорадочных состояний наиболее часто используют нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), которые широко применяют в ревматологии, травматологии, гинекологии, хирургии, для лечения ЛОР-болезней и др. Больные с хроническими болевыми и воспалительными симптомами нередко вынуждены принимать НПВП в течение длительного времени [12].

Поражение суставов и боль в спине являются наиболее частыми состояниями, с которыми больной обращается к врачу и которые приводят к инвалидизации пациентов [3, 4].

По механизму действия НПВП можно разделить на неселективно подавляющие активность циклооксигеназы (ЦОГ-1, ЦОГ-2) и селективные, подавляющие преимущественно активность ЦОГ-2 [13]. В то время как при применении неселективных НПВП возможно развитие язвенного поражения вследствие снижения синтеза гастропротекторных простагландинов, у селективных блокаторов ЦОГ-2 побочным эффектом могут стать тромботические осложнения, в том числе инфаркт миокарда [5, 9].

Серьезным осложнением при фармакотерапии НПВП могут стать желудочно-кишечные кровотечения [11]. Установлено, что более 50 % всех острых желудочно-кишечных кровотечений связаны с приемом НПВП, причем 84 % из них вызваны именно безрецептурными НПВП. Наряду с желудочно-кишечными кровотечениями и бронхиальной обструкцией НПВП могут вызвать острую почечную недостаточность (ин-

дометацин, ибупрофен); тромбоцитопатию с геморрагическим синдромом (ацетилсалициловая кислота) и др. [6, 10, 14]. В настоящее время из-за широкого применения НПВП в клинической практике гастропатии представляют серьезную медико-социальную проблему [7].

Результаты компьютерного прогноза возможных видов фармакологической активности аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты, выполненного по программам ОРАКУЛ и PASS, свидетельствуют о высокой вероятности наличия анальгетических и противовоспалительных свойств, что послужило основанием для проведения данных исследований.

Целью настоящей работы является изучение противовоспалительной и анальгетической активностей аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты.

Материал и методы

Анальгетическую активность аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 1-17) определяли на модели «уксусных корчей» в опытах на белых крысах линии Вистар массой (140-180) г. Корчи вызывали внутрибрюшинным введением 0.75 % раствора уксусной кислоты в дозе 1 мл на 100 г массы тела животного. Подсчет числа корчей проводили через 20 мин после внутрибрюшинного введения уксусной кислоты в течение 30 мин. Исследуемые вещества вводили внутривентрикулярно в дозе 0.05 ЛД₅₀ с помощью специального зонда, за 30 мин до введения

0.75 % раствора уксусной кислоты. Уменьшение количества корчей у животных по сравнению с контрольной группой являлось показателем анальгетической активности веществ. Анальгетическую активность выражали в процентах снижения числа уксусных корчей у опытных животных по сравнению с контрольными группами [1].

Антиэкссудативный эффект аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 1-17) изучили на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением флогогена — каррагенина. Опыты проведены на белых крысах линии Вистар обоего пола массой (140-180) г. Исследуемые вещества вводили в дозе 0.05 LD_{50} внутрижелудочно за 30 мин до введения флогогенного агента. Животным контрольных групп вводили дистиллированную воду. Через 30 мин под апоневроз задней лапы крысы вводили по 0.1 мл 1 % водной суспензии каррагенина. С помощью онкометра измеряли объем лапы у крыс до начала эксперимента и через каждый час в течение 4 ч. Антиэкссудативную активность определяли по степени уменьшения экспериментального отека у

опытных животных по сравнению с животными контрольной группы и выражали в процентах. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак ($ED_{50} = 8$ мг/кг). Степень угнетения отека вычисляли по формуле:

$$\% \text{ угнетения} = \frac{Y_k - Y_o}{Y_k} \times 100$$

где:

Y_k, Y_o — объем лапы животных в контроле и в опыте, соответственно [1, 2].

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики по критерию *t* Стьюдента с использованием программного обеспечения «Windows-2000», электронных таблиц Excel и пакета математической обработки Mathcad 5.0.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ экспериментальных данных (Табл. 1) показывает, что среди аммонийных солей 1-метилимидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 1-6) выраженную анальгетическую активность проявила моноэтаноламиновая соль 1-метилимидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединение 5), которая в дозе 30.5 мг/кг вызывала у крыс уменьшение

Таблица 1

Анальгетическая и противовоспалительная аммонийных солей замещенных имидазо-[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (n = 7)

Соединение	Доза мг/кг	Анальгетическая активность			Противовоспалительная активность		
		количество корчей	% к контролю	активность, %	объем лапы через 4 ч, мм	% к контролю	% угнетения отека
1	50.0	41.1±1.45	81.5	18.5	1.82±0.05	83.9	16.1
2	50.0	32.7±1.32*	64.9	35.1	1.47±0.06*	67.7	32.3
3	22.5	55.1±1.24	109.3	—	2.11±0.04	97.2	2.8
4	25.8	34.4±1.53*	68.3	31.7	1.54±0.08*	71.0	29.0
5	30.5	30.4±1.07*	60.3	39.7	1.42±0.04*	65.4	34.6
6	37.8	32.3±0.97*	64.1	35.9	1.53±0.04*	70.5	29.5
контроль	—	50.4±1.59	100	—	2.17±0.04	100.0	—
7	41.4	32.1±1.06*	65.1	34.9	1.62±0.05*	72.6	27.4
8	39.0	33.1±0.91*	67.1	32.9	1.64±0.06*	73.5	26.5
9	25.3	49.4±1.57	100.2	—	2.27±0.04	101.8	—
10	40.5	28.2±0.99*	57.2	42.8	1.42±0.04*	63.7	36.3
11	16.3	31.3±1.27*	63.5	36.5	1.58±0.04*	70.8	29.2
12	27.1	38.3±1.02*	77.7	22.3	1.80±0.08	80.7	19.3
13	36.0	27.9±1.58*	56.6	43.4	1.35±0.08*	60.5	39.5
контроль	—	49.3±1.38	100	—	2.23±0.04	100	—
14	40.0	40.7±1.08	80.9	19.1	1.90±0.03	84.1	15.9
15	7.2	26.9±1.26*	53.5	46.5	1.24±0.04*	54.9	45.1
16	33.5	37.3±1.08*	74.2	25.8	1.72±0.05*	77.1	22.9
17	36.5	38.4±1.13*	76.3	23.7	1.88±0.04*	83.2	16.8
диклофенак	8.0	27.2±1.9*	54.1	45.9	1.25±0.05*	55.3	44.7
контроль	—	50.3±1.18	100	—	2.26±0.04	100	—

Примечание.

* — различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

количества укусных корчей на 39.7 % ($p < 0.05$). Замена моноэтаноламинового остатка молекулы 1-метилимидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединение 5) на 4'-метилпиперидиновое (соединение 6), пиперидиновое (соединение 2), морфолиновое (соединение 4), гексаметиленаминовое (соединение 1) и этаноламиновое (соединение 3) основание приводит к снижению обезболивающего эффекта.

Большинство аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 7-17) проявили анальгетическую активность, уменьшая количество корчей у крыс на (19.1-46.5) %. Наиболее выраженное антиноцицептивное действие оказывало соединение 15, которое уменьшало количество укусных корчей на 46.5 % ($p < 0.05$).

Анальгетическую активность исследованных аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты можно представить в следующей последовательности: моноэтаноламиновая соль (соединение 15) > этиламинная соль (соединение 13) > метиламинная соль (соединение 10) > 4'-метилпиперидиновая соль (соединение 11) > этилендиаминная соль (соединение 7) > *N,N*-ди(β-гидроксиэтил)аминовая соль (соединение 8) > морфолиновая соль (соединение 16) > пиперидиновая соль (соединение 17) > пирролидиновая соль (соединение 14) > диэтаноламиновая соль (соединение 12).

Результаты изучения антиэкссудативной активности аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 1-17) представлены в Табл. 1. Установлено, что среди аммонийных солей замещенных 1-метилимидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 1-6) выраженную противовоспалительную активность проявила моноэтаноламиновая соль 1-метилимидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединение 5), которая в дозе 30.5 мг/кг вызывала у крыс угнетение развития флогогенного отека лапы на 31.7 % ($p < 0.05$).

Возможно, что противовоспалительный эффект аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты реализуется посредством ингибирования генов, ответственных за синтез провоспалительных цитокинов, и усиления экспрессии этих генов [8].

Более выраженную антифлогистическую активность проявили большинство аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты (соединения 7-17), которые угнетали проявление экссудативной реакции на действие флогогенного агента на (15.9-45.1) %.

Выявлено высокоэффективное соединение 15, которое в дозе 7.2 мг/кг вызывало угнетение развития флогогенного отека лапки на 45.1 % ($p < 0.05$). Замена моноэтаноламинового (соединение 15) остатка в молекуле замещенных имидазо-[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты на этиламинный (соед. 13), метиламинный (соед. 10), 4'-метилпиперидиновый (соединение 11), этилендиаминный (соединение 7), *N,N*-ди-(β-гидроксиэтил)-аминовый (соединение 8), морфолиновый (соединение 16), диэтаноламиновый (соединение 12), пиперидиновый (соединение 17) и пирролидиновый (соединение 14) заместители приводит к уменьшению антифлогистической активности.

Выводы

Исследованы анальгетический и противовоспалительный эффекты аммонийных солей замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты.

Выявлено вещество (соединение 15), которое обладает выраженным антиноцицептивным и антифлогистическим действием, не уступающим по анальгетической и противовоспалительной активности диклофенаку, что представляет перспективным для изучения специфической активности в качестве нестероидного противовоспалительного препарата.

Аммонийные соли замещенных имидазо[1,2-*f*]ксантинил-8-уксусной кислоты являются перспективной группой органических веществ для дальнейшего целенаправленного синтеза и проведения фармакологического скрининга для создания новых нестероидных противовоспалительных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / Под ред. О.В. Стефанова. — К.: Авіцена, 2001. — С. 433-443.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXEL — К.: Морион, 2000. — 320 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — 15-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: ООО Изд-во «Новая волна», 2005. — 1200 с.
4. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы // Русский медицинский журнал. — 2002. — Т. 10, № 4. — С. 206-212.
5. Насонова В.А. Рациональное применение нестероидных противовоспалительных препаратов в ревматологии // Там же. - № 6. — С. 302-306.
6. Сороцкая В.Н., Каратеев А.Е. Желудочно-кишечные осложнения как одна из причин смерти больных ревматическими заболеваниями // Научно-практическая ревматология. — 2005. — № 4. — С. 34-37.
7. Чичасова Н.В., Имамединова Г.Р., Насонов Е.Л. Целебрукс в лечении заболеваний суставов у больных с факторами риска развития гастропатий и сердечно-сосудистой патологии // Там же. — 2004. — № 1. — С. 39-42.

8. Katzung B.G. Basic and Clinical Pharmacology. — 9th ed. — San-Francisco: The McGraw-Hill Companies, 2004. — 1227 p.
9. Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-1 study / Singh G., Fort J., Goldstein J. et al. // Am. J. Med. — 2006. — Vol. 119. — P. 255-266.
10. Deeks J., Smith L.A., Bradley M.D. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systemic review of randomized controlled trials // Brit. Med. J. — 2002. — Vol. 325. — P. 619-626.
11. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor / Goldstein J.L., Silverstein F.E., Agrawal N.M. et al. // Am. J. Gastroenterol. — 2000. — Vol. 95. — P. 1681-1690.
12. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study / Warrington K.J., Kent P.D., Frye R.L. et al. // Arthritis Res. Ther. — 2005. — Vol. 7, № 5. — P. 984-991.
13. Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction / Gislason G., Jacobsen S., Rasmussen J. et al. // Circulation. — 2006. — Vol. 113, № 25. — P. 2906-2913.
14. Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a report of four / Crofford L.J., Oates J.C., Cune W.J. et al. // Arthritis Rheum. — 2000. — Vol. 43. — P. 1891-1896.

Резюме

Корнієнко В.І., Самура Б.А., Літаров В.Є.

Дослідження антиноцицептивної та антифлогістичної активності амонійних солей заміщених імідазо-[1,2-*f*]ксантиніл-8-оцтової кислоти

Проведено скринінгові дослідження амонійних солей заміщених імідазо[1,2-*f*]ксантиніл-8-оцтової кислоти та показано їх вплив на перебіг запального процесу і чутливість вісцеральних ноцицепторів. У результаті дослідження анальгетичної активності виявлено сполуку, що виявляє знеболювальну дію, а також виражену антиексудативну дію,

порівняну із дією диклофенаку. Амонійні солі заміщених імідазо[1,2-*f*]ксантиніл-8-оцтової кислоти є перспективною групою для подальшого проведення синтезу та фармакологічного скринінгу з метою створення речовин, що виявляють анальгетичні та протизапальні властивості.

Summary

Kornienko V.I., Samura B.A., Litarov V.E.

Study of antinociceptive and antiinflammatory effects of ammonium salts of substituted imidazo[1,2-*f*]xanthinyl-8-acetic acid

It was conducted screening studies of ammonium salts of substituted imidazo-[1,2-*f*]xanthinyl-8-acetic acid. It was shown that their impact on the course of inflammatory process and the sensitivity of visceral nociceptors. At the result of experimental study of analgesic effect was found the compound with analgesic effect, comparable to diclofenac effect. At the study of antiinflammatory effect one of studied compounds had expressed antiexudative effect, which did not yield to diclofenac effect. Ammonium salts of substituted imidazo-[1,2-*f*]xanthinyl-8-acetic acid were prospective group for farther conducting of the synthesis and pharmacological screening for the development of substances with analgesic and antiinflammatory effects.

Корнієнко Валентина Івановна. Ст. преподаватель кафедры фармакологии и токсикологии Харьковской государственной зооветеринарной академии.

Самура Борис Андреевич. Д.фарм.н. Професор. Зав. кафедрой фармакотерапии Национального фармацевтического университета.

Літаров Владимир Евгеньевич. Д.мед.н. Професор. Зав. кафедрой фармакологии и токсикологии Харьковской государственной зооветеринарной академии

Організація діяльності фармацевтичних підприємств

УДК 615.15:658.310.8.012.32

Дьякова Л.Ю., Немченко А.С., Носенко О.А.
Національний фармацевтичний університет

Управління внутрішнім навчанням і розвитком персоналу аптечних закладів в умовах впровадження належних практик (GDP і GPP)

У контексті розвиваючого управління персоналом проведено зіставлення понять «навчання» та «розвиток». Запропоновано класифікацію та наведено характеристику видів внутрішнього професійного навчання, що сприяють розвитку працівників. Розроблено процесну модель управління розвитком персоналу аптечних закладів. Обґрунтовано принципи побудови моделі та описано окремі циклічні й оціночні блок-процеси. Уточнено практичну адекватність запропонованої моделі та її узгодженість із системою забезпечення якості аптечного закладу.

Однією з важливих умов успішної діяльності будь-якої організації є розвиток її персоналу. Особливого значення дане питання набуває при впровадженні стандартів належних практик у сучасну діяльність аптек і фармацевтичних фірм. Забезпечення якості лікарських засобів (ЛЗ) в аптечних закладах, а також безперервне покращення якості обслуговування при дистрибуції ЛЗ та якості фармацевтичної допомоги у процесі роздрібною реалізації ЛЗ передбачає відповідні вимоги до персоналу та потребує висококваліфікованих професійних знань, умінь і навичок [3, 4].

Вітчизняні науковці наголошують на актуальності підвищення професіоналізму й компетентності персоналу аптечних закладів. На сторінках фахових та інших професійних видань значна увага приділяється проблемам освіти та підвищення кваліфікації фахівців фармації. Тривають дослідження щодо розробки кваліфікаційних характеристик і створення моделі компетенцій фармацевтичних працівників [6, 7, 9].

При цьому недостатньо розкритими залишаються надзвичайно важливі при впровадженні стандартів належних практик питання внутрішнього навчання й розвитку персоналу аптек і фармацевтичних фірм. Зазначена проблематика ще більше актуалізується стійкою тенденцією світової практики управління до розширення використання ідей і елементів підходу, в основу якого покладено індивідуальний підбір роботи або функції для конкретного працівника. Реалізація ж такого підходу передбачає поглиблене вивчення та подальший розвиток можливостей і прагнень кожного працівника для максимального залучення його до процесу покращення діяльності організації.

Метою даної роботи є обґрунтування й розробка процесної моделі управління розвитком персоналу, а також упорядкування й узагаль-

нення видів внутрішнього професійного навчання, що сприяють розвитку працівників аптечних закладів.

Для досягнення поставленої мети використано системний і процесний підходи, методи порівняльного аналізу, моделювання, блочний метод.

Згідно з концепцією кадрового менеджменту, орієнтованого на бачення розвитку організації, чим більші зміни відбуваються в умовах оточуючого середовища, тим важливішою стає вимога подальшого розвитку працівника протягом усієї його трудової діяльності. Навчання та розвиток персоналу допомагають організації стати більш гнучкою, діяти упереджено й орієнтуватися на інтереси споживачів в умовах жорсткої конкуренції, а також є важливим інструментарієм мотивації [2].

Саме через розвиток кадрового потенціалу організація вирішує завдання розширення працівниками професійної компетентності та опанування ними тих видів діяльності, що важливі для них особисто й для суспільства в цілому, приносять їм задоволення, свободу та забезпечують збалансованість їх інтересів щодо навчання, праці, сім'ї та відпочинку. При цьому мова йде про комплексний розвиток кадрового потенціалу, орієнтований одночасно на працівників, споживачів, власників і зовнішнє оточення й досягнення взаємної відповідності їх потреб [10].

У провідних іноземних компаніях акцент на навчанні й розвитку персоналу нині переріс у філософію, яка визнає, що для перетворення організаційної культури у культуру, де кожний турбується про інтереси споживача, насамперед, необхідно надати можливість навчатися й розвиватися як керівництву, так і кожному окремому працівнику [1, 23].

На думку фахівців у галузі психології праці, центральна проблема становлення професіонала

полягає у налагодженні взаємної відповідності та взаємної узгодженості людини як суб'єкта праці, з одного боку, та об'єктивних вимог соціально фіксованого робочого місця, з іншого. Формально суть зазначеного можна передати як доповнення вихідної системи «суб'єкт — об'єкт» на більш розгорнуту форму: система «суб'єкт — [суб'єкт — соціальне середовище — об'єкт] п». Зазначене підтверджується „золотим правилом психології праці”, згідно з яким задачі підвищення ефективності діяльності організації можуть бути вирішені успішно при додержанні двох умов [8]:

- забезпечення взаємної відповідності особливостей суб'єкта праці й робочого місця;
- забезпечення розвитку кожного працівника як особистості, як індивідуальності, формування його індивідуального стилю діяльності та стилю життєдіяльності.

Щодо забезпечення розвитку працівників зауважимо, що поняття «розвиток персоналу» та «розвиток людських ресурсів» активно використовуються науковцями вже понад двадцять років [1, 2]. Проте ця галузь теорії й практики управління є порівняно новою і постійно оновлюється через необхідність удосконалення стратегії організації в умовах переорієнтації діяльності на інтереси споживачів і нестабільність організаційної структури, зовнішнього середовища, бізнес-процесів [19]. До цього часу тривають дискусії науковців щодо розуміння понять «навчання» і «розвиток». Практичні працівники також неоднозначно оперують зазначеними поняттями. Суть різниці між ними наведено в Табл. 1.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика понять «навчання» та «розвиток» персоналу

Навчання	Розвиток
набуття знань проводиться під керівництвом інструктора	набуття знань проводиться під керівництвом інструктора, а також самостійно
сприйняття матеріалу через взаємовідносини «учитель - учень» або «викладач - студент»	паралельно зі сприйняттям матеріалу, мобілізуються власні погляди
розглядається як можливість набуття знань	розглядає навчання як одну з можливостей набуття знань
передбачає наявність сприйнятливості до набуття знань	передбачає постійне підвищення здібності навчатися (навчання навчанню)

Таким чином, навчання персоналу — це систематичні зусилля, спрямовані на опанування

необхідних знань і навичок шляхом інструктування або виконання практичних вправ. На противагу, розвиток людських ресурсів — інтегрований і цілісний, свідомий і активний підхід до удосконалення пов'язаних із професійною діяльністю знань і поведінки із залученням навчаючих методів і стратегій. У широкому розумінні розвиток людських ресурсів можна інтерпретувати як здатність інтегрувати навчання у поведінку [1, 2, 17].

Саме тому система професійного навчання в організації має бути відпрацьована так, щоб максимально вирішувати задачу професійного розвитку працівників і розвитку організації в цілому. Для цього слід використовувати гнучкі й багатофункціональні засоби, орієнтовані на вирішення завдань різної складності [12]. Детальний аналіз і узагальнення вітчизняних і зарубіжних літературних джерел з означеної тематики дозволили запропонувати класифікацію професійного навчання персоналу аптечних закладів (Табл. 2).

Управління розвитком персоналу аптек і дистриб'юторів лікарських засобів, які орієнтують свою діяльність на інтереси пацієнтів/споживачів, разом із досягненням високих показників професійної компетентності, на думку авторів, передбачає досягнення відповідних показників соціальної компетентності й компетентності особистості кожного працівника згідно зі стратегією розвитку організації. У такому розумінні розвиток персоналу є фундаментальною складовою загального процесу управління персоналом, інтегрально пов'язаною із розвитком аптечного закладу.

Вищезазначене потребує відповідної моделі управління розвитком персоналу, тобто визначення загальних напрямків дій, у межах яких планують і реалізують заходи, використовують відповідні інструменти, спрямовані на оптимізацію складових кадрового потенціалу. Враховуючи позитивні тенденції щодо впровадження стандартів належних практик у діяльність вітчизняних аптек і фармацевтичних фірм, така модель має передбачати узгодження із системою забезпечення якості (СЗЯ), бути адекватною їй та ґрунтуватись на процесному й системному підходах. Для розв'язання зазначеної проблеми нами була розроблена процесна модель управління розвитком персоналу аптечних закладів (Рисунок).

Запропонована процесна модель складається із семи блок-процесів. Відносно внутрішнього середовища аптечного закладу блок-процес 0 є зовнішнім, блок-процеси 1-6 — внутрішніми. За характером перебігу блок-процеси 0, 2, 4 і 6 — оціночні; 1, 3 і 5 — циклічні.

Оціночні блок-процеси передбачають вимірювання відповідного ресурсу керівника, кадрового потенціалу аптечного закладу, ступеня реалізації потенціалу та ресурсу розвитку персоналу організації за певними (визначеними) критеріями із подвійним результатом: у дискретний момент часу та у часі на перспективу. Зазначене дозволяє виявити й зіставити майбутній потенціал працівників і результати їх діяльності у минулому.

Циклічні блок-процеси відображають ітеративність формування в організації стратегії щодо забезпечення якості й впровадження стандартів належних практик, прийняття й реалізації управлінських рішень, трансформації професіоналізму й компетентності персоналу в результати діяльності. Проміжний результат циклічного блок-процесу через зворотний зв'язок формує вхід у цей же процес, забезпечуючи його ітеративність.

Таблиця 2

Класифікація внутрішнього професійного навчання персоналу аптечних закладів

Критерій класифікації	Вид навчання	Характеристика	Літературне джерело
за узгодженням із СЗЯ	первинне	проводиться із недавно прийнятими до фармацевтичного закладу працівниками	4, 5
	періодичне	проводиться у межах безперервного навчання згідно зі складеним графіком	
	термінове	проводиться при виявленні помилок, що можуть або вже призвели до критичних невідповідностей у забезпеченні якості ЛЗ або неналежної якості фармацевтичної допомоги	
	спеціальне	проводиться (переважно персонально) при виникненні виробничої необхідності або у зв'язку із нововведеннями	
за широтою охоплення персоналу	індивідуальне	проводиться персонально з окремими працівниками	5, 18
	групове	проводиться із групою працівників, які виконують однорідну роботу, один процес або взаємопов'язані при розгортанні міжфункціонального процесу	
	колективне	поширюється на весь персонал фармацевтичного закладу	
за зв'язком із виконуваною роботою	на робочому місці	орієнтоване на вузьку професійну спеціалізацію	19, 22
	поза робочим місцем	спрямоване на широкий спектр професійних інтересів	
за очікуваними результатами	вертикальне	передбачає набуття умінь належним чином виконувати роботу або виконувати її краще	15
	горизонтальне	проводиться для набуття персоналом нових умінь і навичок, відмінних від наявних	
за залученістю персоналу до процесу навчання	ситуаційне	засноване на діях у щоденних ситуаціях, є результатом процесу соціалізації у конкретній організації та нерозривно пов'язане з її практичною діяльністю	11, 18, 22, 25
	описово-процедурне	засноване на раніше набутому і/або узагальненому досвіді, зміст опановується шляхом сприйняття інформації, згрупованої суб'єктом навчання в окремі блоки	
за способом отримання знань	традиційне	передбачає особисту участь і безпосередній контакт із викладачем, консультантом, наставником працівника, який навчається	16, 20, 24
	дистанційне	передбачає використання інтернет-технологій для проведення навчальних заходів	
	змішане	комбінування традиційних і електронних засобів, враховуючи онлайн-обмін досвідом	
за рівнем навчання в організації, що постійно вдосконалюється	одноконтурне	набуття персоналом вмінь забезпечити дотримання існуючих норм і стандартів	13, 14, 21
	двоконтурне	набуття вмінь переглядати (удосконалювати) норми і стандарти, враховуючи думку зовнішніх і внутрішніх споживачів	
	дейтеронавчання	набуття вмінь навчатися (навчання навчання) і тим самим створювати середовище, в якому організація буде конкурентоспроможною й успішною на довгострокову перспективу	

Блок-процеси утворюють взаємопов'язану послідовність: по-перше, чергуються циклічні й оціночні процеси; по-друге, вихід попереднього процесу є входом для наступного. При цьому не лише формуються внутрішні входи-виходи, а й передбачається механізм взаємозбагачення досвідом, що відображено в моделі рівновагою $X^P \leftrightarrow Y^P$. Вихід останнього оціночного процесу (блок-процес 6) утворює додаткові входи у циклічні блок-процеси 1, 3 та 5, відображаючи таким чином механізм постійного покращення через оцінку й вимірювання, з урахуванням поведінки персоналу та виявлення особистісного ставлення при виконанні усіх процесів і функцій організаційної діяльності.

Входом у процесну модель є вплив зовнішнього середовища, визначальний фактор якого — стан розвитку фармацевтичної галузі. Тому у зовнішньому по відношенню до організації блоці процесної моделі розглядається якість діяльності фармацевтичної галузі. При цьому реальний стан галузі (Z^1) у дискретний момент часу формується за рахунок двох складових. Перша складова — досвід, набутий і накопичений провідними фахівцями галузі під час досягнення певних результатів (Z^1 , Y^1). Друга складова — потенційні можливості подальшого розвитку й удосконалення якості у фармацевтичній галузі (Z^2 (X^{3c} , X^{3b} , X^{3m} , X^{3a})), зумовлені розвитком суспільства й держави, потребою гармонізації законодавчої бази фармацевтичного сектору України зі стандартами й директивами ЄС, перспективно новими здобутками фармацевтичних наукових шкіл, у тому числі щодо управління якістю та управління персоналом, а також активною передачею здобутків і досвіду передовими фармацевтичними організаціями. Таким чином, зазначений блок-процес відображає у часі стан безперервного удосконалення діяльності галузі (Z^1), результатами якого (Y^1) є нові досягнення, напрацювання та здобутки, що оцінюються й сприймаються фахівцями фармацевтичних організацій під час навчання або консультування, впроваджуються й апробуються при вирішенні актуальних задач на рівні окремого аптечного закладу.

Результати попереднього процесу є входом у блок-процес 1, що відображає замкнутий циклічний процес формування стратегії фармацевтичної організації щодо забезпечення якості та впровадження стандартів належних практик. Із урахуванням проведеного навчання або консультування, керівники або група фахівців, які займаються в організації впровадженням стандартів належних практик і/або стандартів ISO серії 9000, діагностують існуючий стан

щодо забезпечення якості в організації і, згідно з отриманими результатами, здійснюють розробку, підтримку або вдосконалення політики якості, внутрішньоорганізаційних стандартів якості, СЗЯ, інтегрованої з управлінням персоналом, та системи документування. Проміжним результатом зазначеного процесу є ступінь сприйняття в організації ідеології якості та рівень впровадження внутрішньоорганізаційних стандартів якості. Зворотний зв'язок даного процесу формується за рахунок реакції людського фактору й зумовлює своєчасність коректив щодо забезпечення якості, а також повноту реалізації функцій і ролей персоналу як у керуючій, так і у керованій підсистемах СЗЯ. Підсумковим результатом описаного процесу є інтеграція механізму управління якістю й управління персоналом у СЗЯ, що сприяє позитивним змінам в організації, спонукає керівництво до об'єктивної самооцінки та впливає на зміни у зовнішньому середовищі. Крім того, до підсумкових результатів блок-процесу 1 можна віднести взаємозбагачення знань і досвіду ($X^P \leftrightarrow Y^P$), тобто набуття знань керівниками, що навчаються, і накопичення досвіду консультантами.

Безумовно, парадигму управління визначають організаційні умови. При впровадженні стандартів належних практик таку парадигму визначатиме якість обслуговування споживачів або якість фармацевтичної допомоги. Проте конкретні управлінці можуть мати різні пріоритети. При цьому не виключена їх орієнтація на підвищення прибутку, незалежно від способу його отримання. Блок-процес 2 передбачає самооцінку потенціалу (ресурсу) керівника й у дискретний момент часу дозволяє об'єктивно оцінити стан управлінських можливостей (Z^P_k) за такими складовими, як рівень компетентності й професіоналізму, організаторські здібності, стиль управління, психофізичні здібності та особисті якості. На кожну складову стану (Z^P_k) впливають фактори зовнішнього оточення (X^{3b}), а успішній діяльності сприяють набуті досвід і знання (X^P). Результат процесу відображає здібності та вміння керівників до командної і міжгрупової роботи. Зауважимо, що цільовою орієнтацією блок-процесу 2 є досягнення управлінською командою стану успішного управління ресурсами, що забезпечує найкращі кількісні й якісні показники діяльності та сприяє особистому авторитету керівників. Управління персоналом вимагає від керівників навичок саморозвитку, розвитку підлеглих і популяризації ідей розвитку в організації. Тому результативність даного процесу в часі залежить від команди керівників,

їх бажання і вміння управляти, розвивати свою управлінську компетентність, у тому числі щодо управління якістю й управління персоналом, та обмінюватись досвідом роботи.

У блоці 3 відображено замкнутий циклічний процес прийняття й реалізації управлінських рішень. Процес наведено у вигляді закономірної послідовності основних етапів прийняття управлінського рішення із зазначенням зв'язків. При цьому зворотний зв'язок забезпечується результатами аналізу виконаних рішень. Підсумковим результатом процесу є відпрацювання управлінською командою дієвих технологій управління персоналом і технологій ситуаційного управління. За таких умов взаємодія керівників із персоналом організації викликає відповідну реакцію персоналу, що не лише призводить до збагачення досвіду обох сторін ($X^p \leftrightarrow Y^p_k$), а й впливає на різні сфери зовнішнього оточення.

Проте такого взаємозбагачення недостатньо. Розвиваючися сам, керівник повинен цілеспрямовано розвивати своїх підлеглих і спонукати їх до саморозвитку. Розвиток людських ресурсів необхідно вважати одним з обов'язкових аспектів його професійної діяльності (X^p). Крім того, мінливе зовнішнє середовище ($X^{зв}$) вимагає пізнання й розуміння не лише сучасних, а й подальших тенденцій розвитку людських ресурсів. Для багатьох управлінців це означає зміну особистого сприйняття процесу управління людьми. Блок-процес 4 дозволяє команді управлінців у дискретний момент часу продіагностувати стан кадрового потенціалу організації (Z^p_n), враховуючи соціальну структуру персоналу, його професійно-кваліфікаційний склад, компетентність працівників, якості особистостей працюючих (компетенції особистостей), взаємовідносини у групах і колективах. Результат процесу відображає реальні можливості й виконавчу дисципліну персоналу організації. Цільовою орієнтацією процесу моніторингу та діагностики стану кадрових ресурсів є формування готовності колективу до вирішення завдань різної складності, посилення позитивних характеристик і задоволеності персоналу, усунення негативних характеристик і причин незадоволеності працівників, пошук шляхів подолання ризиків, пов'язаних із персоналом. Слід зауважити, що результативність цього процесу у часі може бути позитивною й негативною ($\pm Y^p_n$), і, відповідно, означає успіх перетворень або конфлікти та стагнацію. Розповсюджуючись в аптечному закладі та за його межами, зазначене впливатиме на ефективність діяльності й відображатиметься на конкурентоспроможності організації на фармацевтичному ринку.

Замкнутий циклічний блок-процес 5 відображає трансформацію професіоналізму й компетентності персоналу в результати діяльності. Вхід до процесу ($\pm Y^p_n$) дає можливість розглядати продуктивність праці в організації з точки зору людської поведінки, що її забезпечує. Безумовно, найефективнішим засобом підвищення професіоналізму й компетентності є навчання персоналу. У діючих нормативних документах України щодо забезпечення якості ЛЗ навчання персоналу (паралельно з вимогами до його освітньо-кваліфікаційного рівня) приділяється значна увага. Проте уніфікований механізм або заходи відносно організації навчання не наведені. Тому аптечному закладу необхідно розробити власну систему навчання персоналу та її документальний супровід, що за викладеними положеннями і формою мають бути узгоджені з єдиною системою документування СЗЯ й документообігу організації. Проміжним результатом даного процесу є підтримання належного рівня і/або удосконалення якості виконуваних робіт. Але трансформація професіоналізму й компетентності персоналу в результати діяльності буде успішною лише за умови узгодження стратегії розвитку аптечного закладу з індивідуальними стратегіями розвитку його головного ресурсу — працівників. Зазначеного стану можна досягти через реалізацію зворотного зв'язку. Підсумковим результатом процесу є вибір керівниками і персоналом своєчасних і узгоджених дій для практичної реалізації стратегії фармацевтичної організації щодо якості. Періодичний аналіз підсумків діяльності з оцінкою результативності дозволяє виявити причини високих досягнень або допущених помилок, а моделювання різних ситуацій — прогнозувати тенденції. Таким чином, процес відображає характер трансформації людських ресурсів у результати діяльності/активи належного рівня якості ($X^p \leftrightarrow Y^p_n$) і дозволяє управлінській команді розглядати свою роботу з урахуванням потенційних ресурсів, як рушійної сили фармацевтичного бізнесу.

У блоці 6 наведено процес оцінки ступеня реалізації потенціалу та ресурсів розвитку персоналу організації, який у дискретний момент часу дозволяє оцінити загальний стан людських ресурсів організації за двома складовими ($Z^p_{реал}$ і $Z^p_{розв}$). Ступінь реалізації потенціалу персоналу ($Z^p_{реал}$) передбачає оцінку трудової активності й досягнень персоналу за минулі періоди з урахуванням показників ефективності особистої праці на робочому місці, соціального спрямування професійної діяльності, діяльності щодо покращення роботи колективу. Складова $Z^p_{розв}$

передбачає виявлення ресурсів розвитку персоналу через удосконалення механізмів управління розвитком організаційної структури, системою комунікацій, ефективністю праці, матеріальними й нематеріальними системами стимулювання праці, соціально-психологічним розвитком особистості й колективу, здоров'ям та безпекою персоналу. Цільовою орієнтацією даного процесу у часі є забезпечення мобілізації резервів підвищення ефективності та якості діяльності персоналу, усунення виникаючих перешкод і мотивація працівників. Результати блок-процесу 6 відображають:

- підтримання персоналом аптечного закладу ідеології якості та бачення ним подальшого розвитку організації відносно вдосконалення якості обслуговування/надання фармацевтичної допомоги;
- управлінський досвід і ступінь саморозвитку управлінського потенціалу керівників;
- трудову активність працівників.

У запропонованій процесній моделі вихід блок-процесу 6 забезпечує зворотний зв'язок і утворює входи у циклічні процеси блоків 1, 3 та 5. Так, для подальшого взаємоузгодженого розвитку персоналу й організації необхідним є описання реакції працівників відносно підтримання ними ідеології якості та бачення подальшого розвитку аптечного закладу. Зазначена інформація, нарівні з напрацюваннями, досягненнями та здобутками галузі, перейнятими шляхом навчання або консультування, має стати вхідною основою для адекватних управлінських втручань у процес формування стратегії аптечного закладу щодо якості (блок-процес 1). Для успішного перебігу процесу прийняття й реалізації управлінських рішень (блок-процес 3), разом зі здібностями та вміннями керівників до командної та міжгрупової роботи, суттєве значення має накопичений ними управлінський досвід і ступінь саморозвитку їх управлінського потенціалу. Беззаперечно, входом у процес трансформації професіоналізму й компетентності персоналу в результати діяльності (блок-процес 5) мають бути не лише показники продуктивності праці та виконавчої дисципліни працюючих, а й показники їх трудової активності, враховуючи соціальне спрямування професійної діяльності.

В описаній моделі поєднані різні підходи щодо розвитку людських ресурсів: стратегічний, індивідуальний, підхід і позиції груп і управління змінами, організаційний, підхід із точки зору розвитку бізнесу, що в кінцевому результаті визначатиме системність реалізації усіх функцій управління персоналом з урахуванням бачення,

тобто формування у працівників уявлень про мету розвитку аптечного закладу, а не його сьогочасні інтереси. Таким чином, розвиток людських ресурсів в аптечному закладі відбуватиметься за рахунок дуалізму знань і досвіду під безперервним впливом зовнішнього і внутрішнього середовища.

Наведена процесна модель прийнятна для фармацевтичних організацій, незалежно від того, функції з управління персоналом покладені на окремий підрозділ (служба управління персоналом) або посадову особу (директор з персоналу, HR-менеджер), що відображено в організаційній структурі аптечного закладу, чи управління персоналом в організації розглядається як управління дискретним набором понять і видів поведінки. Практична адекватність запропонованої процесної моделі досягатиметься її адаптацією до особливостей діяльності фармацевтичної організації і підтверджуватиметься структуризацією праці, перерозподілом функціональних обов'язків, специфікацією вхідних/вихідних потоків і технологіями перетворення ресурсів у результати шляхом здійснення основних і допоміжних процесів і функцій.

Висновки

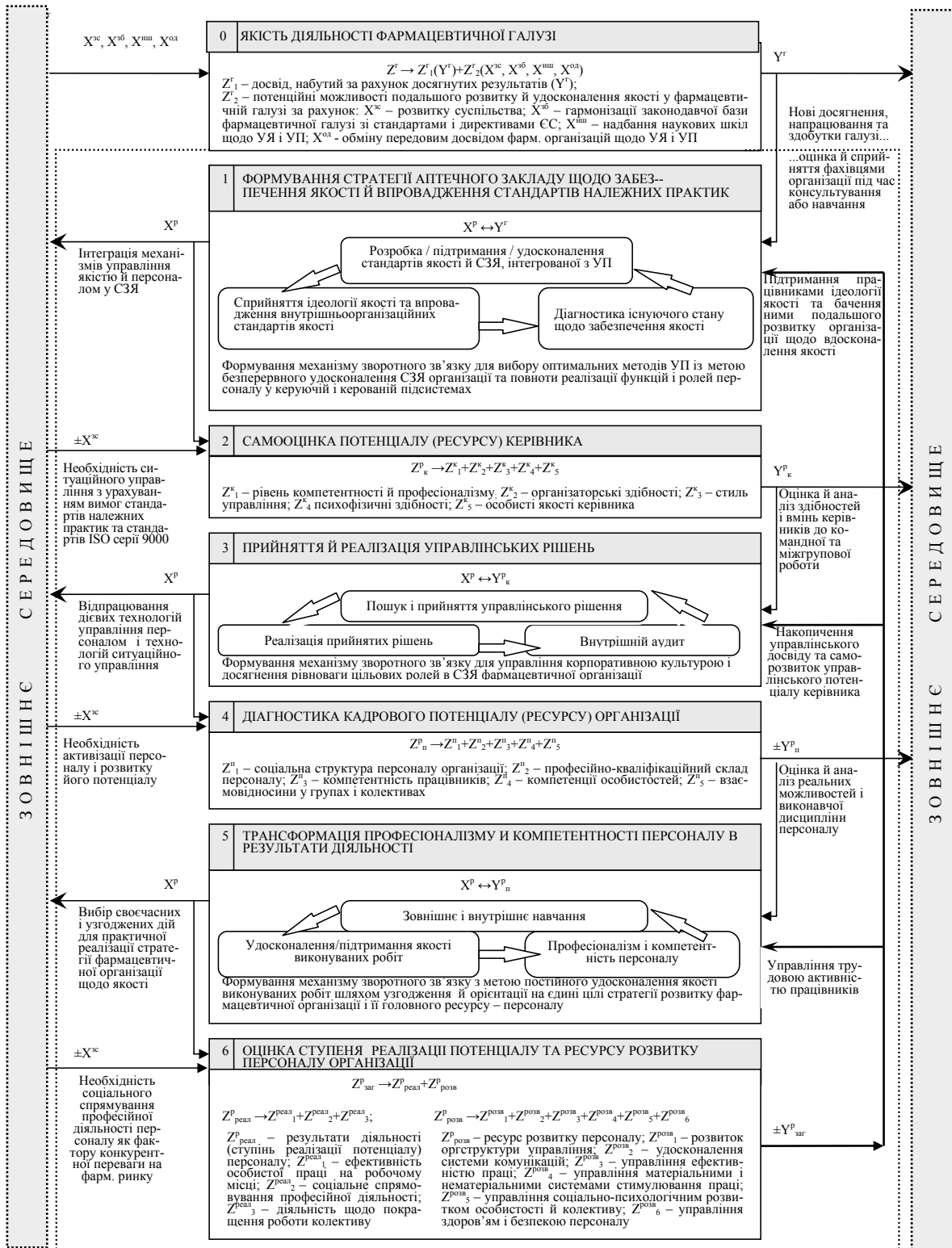
1. На підставі аналізу літературних джерел узагальнено вітчизняний і світовий досвід управління розвитком людських ресурсів, проведене порівняння понять „навчання” і „розвиток” персоналу, охарактеризовано види внутрішнього навчання працівників аптечних закладів.

2. Обґрунтовано необхідність спрямування системи внутрішнього навчання персоналу на вирішення задач професійного розвитку працівників та розвитку аптечного закладу у цілому. Запропоновано класифікацію видів внутрішнього професійного навчання, що дозволить упорядкувати та раціонально застосовувати кожен із видів розвиваючого навчання у практичній роботі аптечного закладу.

3. Розроблено процесну модель управління розвитком персоналу аптечного закладу, що поєднує різні підходи щодо розвитку людських ресурсів, дозволяє виявити і зіставити майбутній потенціал працівників і результати їх діяльності у минулому, передбачає механізми взаємозбагачення досвідом та ітеративності з постійним покращенням роботи працівників при виконанні процесів і функцій організаційної діяльності.

Практичне використання запропонованої процесної моделі забезпечуватиме послідовність розвитку людських ресурсів, дозволить управляти за результатами, сприятиме інтеграції функцій управління персоналом і управлін-

Рисунок



Процесна модель управління розвитком персоналу аптечних закладів

ня якістю та досягненню безперервного покращення якості обслуговування при дистрибуції

ЛЗ і якості фармацевтичної допомоги при роздрібній реалізації ЛЗ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Джой – Метгюз Д., Меггисон Д., Сюрте М. Развитие человеческих ресурсов: Пер. с англ. – М.: Эксмо, 2006. – 432 с.
2. Колпаков В. Управление развитием персонала: теория и практика // Персонал. – 2004. – № 11. – С. 64-69.
3. Немченко А.С., Дьякова Л.Ю., Носенко О.А. Наукове обґрунтування ефективного використання персоналу аптечних закладів відповідно до міжнародних стандартів належної аптечної практики: Методичні рекомендації. – К., 2008. - 24 с.
4. Немченко А.С., Дьякова Л.Ю., Носенко О.А. Системний підхід до управління якістю та персоналом в умовах впровадження належної практики дистрибуції // Фармаком. – 2008. – № 3. – С. 92-98.
5. Нифантьев О.Е. Надеждающая производственная практика (GMP) в вопросах и ответах. Вып. 2, Обучение персонала. – М.: РТК – Регион, 2002. – 160 с.
6. Пономаренко М.С., Бабський А.А., Краснянська Т.М. Законодавчі та нормативно-правові засади розробки кваліфікаційних характеристик на прикладі посади медичного працівника фармацевтичного підприємства // Фармац. журн. – 2008. – № 5. – С. 17-22.
7. Слабий М.В. Аналіз динаміки підготовки провізорів у вищих навчальних закладах МОЗ України за 2001-2006 роки // Фармац. журн. – 2006. – № 6. – С. 22-26.
8. Толочек В.А. Современная психология труда: Учебное пособие. – СПб.: Питер, 2005. – 479 с.
9. Толочко В.М., Галій Л.В. Управління персоналом фармацевтичних організацій на основі створення моделі компетенцій // Фармац. журн. - 2008. – № 5. – С. 12-16.
10. Хильб М. Интегрированный менеджмент персонала. Цели - стратегии - инструменты: Пер. 11-го нем. изд. - М.: Дело и Сервис, 2006. - 256 с.
11. Anderson J.R., Reder L.M., Simon H.A. Situated learning and education // Educational Researcher. – 1996. – №25 (4). – P. 5-11.
12. Andriesson D. Implementing the KPMG Value Explorer. Critical success factors for applying IC measurement tools // Journal on Intellectual Capital. – 2005. – № 6 (4). – P. 474-488.
13. Argyris C. Teaching smart people how to learn // Harvard Business Review. – 1991. – № 69 (3). – P. 99-109.
14. Bateson G. The logical categories of learning and communication: in Steps to an Ecology of Mind. – Chicago: University of Chicago Press, 2000. – P. 7.
15. Boydell T., Leary M. Identifying Training Needs. – London: Institute of Personnel and Development, 1996. – P. 135-138.
16. Clarke C. Towards a Unified e-Learning Strategy: Consultation Document. – London: The Stationery Office, 2003. – P. 1.
17. Coorey J. Develop Your Management Potential: 2nd ed. – London: Kogan Page, 1993. – P. 24.
18. Joy-Matthews J. The situatedness of learning: a phenomenographical study of the personal and professional learning of post and undergraduate students, Doctor of Education thesis. – Sheffield: Sheffield University, 2003. – P. 5.
19. Leavy B. The concept of learning in the strategy field: review and outlook // Management Learning. – 1998. – № 29 (4). – P. 447-466.
20. Rosenberg M.J. E-learning Strategies for Delivering Knowledge in the Digital Age. – London: McGraw-Hill, 2003. – P. 1.
21. Senge P. The Fifth Discipline: The art and practice of the learning organization. – London: Century, 1990. – P. 10.
22. Snell R. Experiential learning at work: why can't it be painless? // PersonnelReview. – 1991. – № 21 (4). – P. 20-27.
23. Stern E., Sommerland E. Workplace Learning, Culture and Performance. – London: Institute of Personnel and Development, 1999. – P. 25-34.
24. Thorne K. Blended Learning: How to integrate online and traditional learning. – London: Kogan Page, 2003. – P. 16.
25. Wilson A. The promise of situated cognition: in An Update on Adult Learning: ed S.B. Merriman. – San Francisco: Jossey-Bass, 1993. – P. 71-79.

Резюме

Дьякова Л.Ю., Немченко А.С., Носенко А.А.

Управление внутренним обучением и развитием персонала аптечных учреждений в условиях внедрения надеждающих практик (GDP и GPP)

В контексте развивающего управления персоналом проведено сопоставление понятий „обучение“ и „развитие“. Предложена классификация и приведена характеристика видов внутреннего профессионального обучения, содействующих развитию работников. Разработана процессная модель управления развитием персонала аптечных учреждений. Обоснованы принципы построения модели и описаны отдельные циклические и оценочные блок-процессы. Уточнена практическая адекватность и согласованность предложенной модели с системой обеспечения качества аптечного учреждения.

Summary

Djakova L.Y., Nemchenko A.S., Nosenko A.A.

Management of internal teaching and development of personnel of pharmaceutical establishments in conditions of introduction of good practices (GDP and GPP)

Comparison of concepts „teaching“ and „development“ in the context of developing a management of the personnel was conducted. Classification was offered and characteristics of types of the internal professional training, promoted development of workers, was given. A process model of the management of personnel of pharmaceutical establishments was developed. Principles of the construction of the model were based, and separate cyclic and evaluating block-processes were described. Practical adequacy and co-ordination of offered model were specified with the system of providing of quality of pharmaceutical establishment.

Дьякова Лариса Юрійвна. Закінчила НФАУ (1997). Асистент кафедри організації та економіки фармації.

Немченко Алла Семенівна. Д.фарм.н. (1993). Професор (1995). Завідувачка кафедри організації та економіки фармації Національного фармацевтичного університету (2004).

Носенко Олександр Анатолійович (н. 1973). Закінчив Національну фармацевтичну академію України (1995). К.фарм.н. (2007). В.о. начальника Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів у Харківській області.