



PHARM PROM

V Міжнародна виставка технологій фармацевтичної промисловості PHARMPROM

14 - 16 жовтня 2014 року



Україна, Київ
вул. Салютна, 2-Б
павільйон №2

За підтримки:

- Комітету Верховної Ради України з питань охорони здоров'я
- Міністерства охорони здоров'я України
- Державної служби України з лікарських засобів

- Національної академії наук України
- Національної академії медичних наук України
- Національного фармацевтичного університету

Організатор:



Партнери:



PHARM SOLUTIONS
PHARM RAW
PHARM EQUIPMENT
PHARM WATER
PHARM COLD&CLIMA
PHARM LAB&Control
PHARM CLEANTECH
PHARM PACK
PHARM HR
PHARM SERVICE



СПЕЦІАЛЬНА ПРОГРАМА «ДНІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ»*

14 жовтня 2014 року

- 11.00–13.00**
зал № 2
Відкрите обговорення «Баланс інтересів держави і бізнесу в регуляторному просторі фармацевтичної галузі»
Організатор: Державна служба України з лікарських засобів
- 10.00–14.30**
зал № 1
Науково-практична конференція «Фармакопейні вимоги контролю якості лікарських засобів в Україні»
Організатор: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»
- 15.00–18.00**
зал №1
Семінар «Проблеми виробництва і дистриб'юції ветеринарних препаратів у сучасних умовах»
Організатор: Громадський союз «Українська асоціація виробників і дистриб'юторів ветеринарних препаратів і кормових добавок»
- 13.30**
вхід F
PHARMDemo-тур: «Сучасне обладнання, сировина і прилади для фармацевтичного виробництва»

15 жовтня 2014 року

- 10.00–18.00**
зал № 1
Семінар «Клапани і технології для стерильних процесів від провідного світового виробника Gemü (Німеччина)»
Організатор: Компанія «КСК-Автоматизація»

16 жовтня 2014 року

- 10.00–15.00**
зал № 1
Семінар «Проведення доклінічних досліджень лікарських засобів» **
Організатор: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»
- 10.00–14.00**
зал № 2
Семінар «Техніка виконання аналітичного експерименту. Помилки аналітичного експерименту в фармацевтичному аналізі» **
Організатор: Компанія «Стандарти Технології Розвиток»
- 12.00**
вхід F
PHARMDemo-тур: «Сучасна лабораторія у фармацевтичному виробництві»

** Для спеціалістів передбачена видача сертифікатів
*У програмі можливі зміни та доповнення

ОДНОЧАСНО ВІДБУДЕТЬСЯ



VII Міжнародний форум «Комплексне забезпечення лабораторій»

www.labcomplex.com

Міжнародні
інформаційні
партнери:



Інформаційні
партнери:



З питань участі у виставках:

+380 (44) 526-92-97 @ pharm@lmt.kiev.ua

З питань участі у науковій та бізнес програмах:

+380 (44) 526-92-89 @ marketing@pharmcomplex.com

www.pharmcomplex.com

Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України

Шпичак О.С., Тихонов О.І., Котов А.Г., Котова Е.Е., Мострянська Н.М.
Розробка проекту монографії «Мед» Державної Фармакопеї України 7

Фітохімічні дослідження

Котова Е.Е., Котов А.Г., Морозов Р.В.
Порівняльний аналіз фармакопейних методик
визначення вмісту ефірної олії в лікарській рослинній сировині 17

Мікаїлова Н.Х., Серкерев С.В.
Діангелат келлактому – новий компонент коріння *Seseli campestre* Bess. 27

Рибалкін М.В.
Обґрунтування оптимального методу
інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*..... 30

Хортецька Т.В., Мазулін О.В., Буряк В.П., Єренко О.К., Мазулін Г.В.
Накопичення аукубіну в листі видів роду *Plantago* L. флори України 34

Хохлова К.О., Вишневська Л.І., Котов А.Г., Кічимасова Я.С.
Стандартизація трави сухоцвіту багнового
згідно вимог Державної Фармакопеї України 38

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

Гризодуб О.І., Євтіфєєва О.А., Проскурин К.І., Безумова О.В.
Стандартизована процедура валідації спектрофотометричних
методик кількісного визначення лікарських засобів
у варіанті методу показника поглинання. Повідомлення 2. 45

Дмітрієва М.В., Лук'янова І.С., Леонтьєв Д.А., Гризодуб О.І.
Результати тестування за показником «Розчинення»
у 10-му раунді Програми професійного тестування лабораторій..... 54

Чикалова С.О., Гризодуб О.І.
Оцінка впливу результатів випробування «Втрата в масі при висушуванні»
на результати кількісного визначення методом титрування 64

Аніщенко С.О., Бєвз Н.Ю., Георгіянц В.А.
Верифікація методик кількісного визначення
гідрохлортиазиду в таблетках та випробування на розчинення 68

Технологія лікарських засобів

Сіденко Л.М., Казарінов М.О., Гончаров М.І., Веселова О.А.
Розробка складу та технології таблеток фозиноприлу
для лікування артеріальної гіпертензії 74

Шакін Є.С., Рибчук В.О., Штейнгарт М.В.
Дослідження кристалічної структури твердої лікарської форми леветирацетаму 81

-
- Рецензенти: чл.-кор. НАНУ, д.фарм.н., професор Георгієвський В.П.; ст. наук. співробітник, к.біол.н. Нікітіна Н.С.; головний наук. співробітник, д.фарм.н. Котов А.Г.; д.фарм.н., професор Півень О.П.; д.хім.н., професор Гризодуб О.І.;
 - Випуск підготували: Саматов Р.С., Волчик І.В., Боярська В.О., Лук'янова О.С., Мострянська Н.М., Вовк О.Г.
 - Рекомендовано до друку вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 2 від 29.04.2014.
 - Підписано до друку 9.09.14. Тираж 500 прим.
-

Синтез та вивчення фармакологічної дії*Саліонов В.О., Панасенко О.І., Книш Є.Г., Камишний О.М., Поліщук Н.М.*Протимікробна активність іліденгідрозидів
2-(4-R-5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот 85*Назарова О.С., Вербова Ю.М., Веселова О.А.*Оцінка еквівалентності *in vitro* генеричного лікарського засобу
в формі таблеток з кандесартану цилексетилом 90**Фармакологічні дослідження***Яковлева Л.В., Єгорова О.О., Кошова О.Ю., Ларьяновська Ю.Б.*Вплив елгацину на вікові зміни морфоструктури
сім'яників та передміхурової залози щурів 99**Фармако-економічні та маркетингові дослідження***Панфілова Г.Л., Цурікова О.В.*Аналіз нормативно-правових та фармакотерапевтичних підходів
у формуванні державних закупівель лікарських засобів
для хворих на гемобластози в Україні 107

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Шпичак О.С., Тихонов А.И., Котов А.Г., Котова Э.Э., Мострянская Н.М.
Разработка проекта монографии «Мед» Государственной Фармакопеи Украины 7

Фитохимические исследования

Котова Э.Э., Котов А.Г., Морозов Р.В.
Сравнительный анализ фармакопейных методик определения содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье..... 17

Микаилова Н.Х., Серкерев С.В.
Диангелат келлактона — новый компонент корней *Seseli campestre* Bess. 27

Рыбалкин Н.В.
Обоснование оптимального метода инактивации клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis*..... 30

Хортецкая Т.В., Мазулин А.В., Буряк В.П., Еренко Е.К., Мазулин Г.В.
Накопление аукубина в листьях видов рода *Plantago* L. флоры Украины..... 34

Хохлова Е.А., Вишневская Л.И., Котов А.Г., Кичимасова Я.С.
Стандартизация травы сушеницы топяной в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины 38

Стандартизация лекарственных средств и валидация методов контроля качества

Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова Е.В.
Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения. Сообщение 2..... 45

Дмитриева М.В., Лукьянова И.С., Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И.
Результаты тестирования по показателю «Растворение» в 10-м раунде Программы профессионального тестирования лабораторий..... 54

Чикалова С.О., Гризодуб А.И.
Оценка влияния результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» на результаты количественного определения методом титрования..... 64

Анищенко С.А., Бевз Н.Ю., Георгиянц В.А.
Верификация методик количественного определения гидрохлортиазида в таблетках и испытания на растворение 68

Технология лекарственных средств

Сиденко Л.Н., Казаринов Н.А., Гончаров Н.И., Веселова Е.А.
Разработка состава и технологии таблеток фозиноприла для лечения артериальной гипертензии..... 74

Шакин Е.С., Рыбчук В.А., Штейнгарт М.В.
Исследования кристаллической структуры твердой лекарственной формы леветирацетама 81

Синтез и изучение фармакологического действия

Салионов В.А., Панасенко А.И., Книш Е.Г., Камышный А.М., Полищук Н.Н.
Противомикробная активность илиденгидразидов 2-(4-*R*-5-(тиофен-2-ил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-илтио)уксусных кислот..... 85

Назарова Е.С., Вербова Ю.М., Веселова Е.А.
Оценка эквивалентности *in vitro* генерических лекарственных средств в форме таблеток с кандесартана цилексетилом..... 90

Фармакологические исследования*Яковлева Л.В., Егорова А.А., Кошечая Е.Ю., Ларьяновская Ю.Б.*

Влияние элгацина на возрастные изменения
морфоструктуры семенников и предстательной железы крыс 99

Фармако-экономические и маркетинговые исследования*Панфилова А.А., Цурикова О.В.*

Анализ нормативно-правовых и фармакотерапевтических подходов
в формировании государственных закупок лекарственных средств
для больных гемобластозами в Украине 107

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 638.16

Шпичак О.С., Тихонов О.І., Котов А.Г., Котова Е.Е., Мострянська Н.М.

Національний фармацевтичний університет

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Розробка проекту монографії «Мед» Державної Фармакопеї України

Проведено огляд літературних джерел та нормативної документації з метою розробки монографії «Мед» Державної Фармакопеї України (ДФУ). Для впровадження в ДФУ монографії «Мед» були оцінені методики контролю якості, гармонізовані з вимогами монографії «Honey» Європейської Фармакопеї (ЄФ), наприклад ідентифікація методом тонкошарової хроматографії з використанням доступних національних стандартів, методики визначення показника заломлення, питомої електропровідності й оптичного обертання. Експериментальні зразки були зібрані на пасіках, розташованих в різних регіонах України, та проаналізовані з використанням сучасного лабораторного обладнання. Аналіз проводили відповідно до методик ЄФ 7.0 та ДСТУ 4497:2005. Результати оцінювали з метою виявлення тенденцій, специфічних для меду, зібраного в конкретній частині країни. Аналіз показав, що більшість зразків відповідають вимогам ЄФ. Дев'ять зразків не відповідають вимогам ЄФ і чотири зразки не відповідають вимогам національного стандарту України за показником заломлення та вмістом води.

Встановлено, що вимоги ДСТУ 4497:2005 та монографії ЄФ «Honey» можуть бути використані для контролю якості меду в Україні, а запропоновані нами вимоги до вітчизняного меду можуть бути введені в ДФУ.

Ключові слова: мед натуральний, Європейська Фармакопея, контроль якості, гармонізація вимог, випробування, Державна Фармакопея України.

Як було зазначено у попередній роботі [1], на даний час якість меду регламентується рядом нормативних документів [2-8].

Метою даної роботи було дослідження якості різних серій меду натурального, зібраного на території різних регіонів України, дослідження його сортів для з'ясування можливості гармонізації вимог національної законодавчої бази з Європейською Фармакопеєю (ЄФ).

Для досягнення поставленої мети необхідно було дослідити вітчизняні зразки меду натурального на відповідність вимогам ЄФ та національного стандарту України [2, 5].

У роботі було використано 70 експериментальних зразків різних сортів меду натурального, зібраного в період 2010-2013 рр. в різних областях та регіонах України (Табл. 1). За кількістю зібрані зразки меду розподілились по областях України таким чином: Харківська обл. — 17 зразків; Вінницька обл. — 9 зразків; Автономна Республіка (АР) Крим — 7 зразків; Донецька обл. — 7 зразків; Сумська обл. — 5 зразків; Житомирська, Миколаївська і Черкаська області — по 4 зразки; Запорізька, Київська і Тернопільська області — по 2 зразки; Волинська, Дніпропетровська, Івано-Франківська, Хмельницька, Чернігівська, Полтавська і Кіровоградська області — по 1 зразку.

Експериментальні зразки меду натурального відбирались з племінних та робочих пасік 17 областей України та АР Крим.

Матеріали, реактиви, розчинники та обладнання:

— ТШХ-пластинки із шаром силікагелю F₂₅₄ Alugram® Silicagel G/UV₂₅₄ (виробництва

Macherey-Nagel, Німеччина) та Silica gel 60 F₂₅₄ (виробництва Merck, Німеччина);

— вода Р, ацетонітрил Р, етанол Р, дифеніламін Р, ацетон Р, фосфорна кислота Р, анілін Р, аміаку розчин концентрований Р, вугілля активоване Р;

— рефрактометр ИРФ-22 (Зав. № 700941);

— вимірювач комбінований Seven Easy cond фірми Mettler Toledo GmbH, Швейцарія (Зав. № 1226126619), з діапазоном вимірювання від 2 мкСм/см¹ до 100 мкСм/см¹;

— поляриметр Polamat А фірми Carl Zeiss Jena, Німеччина;

— фармакопейні стандартні зразки Державної Фармакопеї України (ФСЗ ДФУ) глюкози, фруктози і сахарози.

При порівнянні вимог до якості меду, описаних у ЄФ [2] та ДСТУ 4497:2005 [5], з'ясувалось таке.

Визначення. У монографії ЄФ [2] зазначено, що мед виробляють бджоли (*Apis mellifera* L.) з нектару рослин або із секретів живих частин рослин, які бджоли збирають, перетворюють, об'єднуючи зі специфічними власними речовинами, зберігають, зневоднюють, накопичують і залишають у медових стільниках для витримування та дозрівання.

ДСТУ 4497:2005 поширюється на мед натуральний квітковий і мед натуральний квітковий з домішкою пади — натуральної солодкої речовини, що виробляється медоносними бджолами з нектару квітів або виділень з живих частин рослин чи комах, що паразитують на живих частинах рослин, які бджоли збирають, пере-

Таблиця 1

Відомості щодо експериментальних зразків різних сортів меду натурального

Назва зразка	Дата збирання	Місце збирання за територіальним призначенням
Мед акацієвий	150611	с. Голодьки Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед липово-гречаний	150611	с. Голодьки Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед гречаний	200811	с. Голодьки Хмельницького р-ну, Вінницької обл.
Мед травневий	290511	с. Голодьки Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед акацієвий	070611	с. Ковалівка Немирівського р-ну Вінницької обл.
Мед травневий	250511	с. Дніпровка Кам'янсько-Дніпровського р-ну Запорізької обл.
Мед соняшниковий	220811	с. Дніпровка Кам'янсько-Дніпровського р-ну Запорізької обл.
Мед квітково-липовий	120711	с. Чмирівка Чигиринського р-ну Черкаської обл.
Мед квітково-соняшниковий	100811	с. Тарасо-Григорівка Чигиринського р-ну Черкаської обл.
Мед акацієвий	100611	с. Луковиця Канівського р-ну Черкаської обл.
Мед квітково-гречаний	150811	с. Гізівщина Любарського р-ну Житомирської обл.
Мед квітково-гречаний	220811	с. Нова Котельня Андрушівського р-ну Житомирської обл.
Мед квітково-соняшниково-гречаний	050811	с. Лецьки Переяслав-Хмельницького р-ну Київської обл.
Мед квітково-липовий	180711	с. Лецьки Переяслав-Хмельницького р-ну Київської обл.
Мед квітково-акацієвий	140611	с. Конюхи Козівського р-ну Тернопільської обл.
Мед квітково-соняшниковий	100711	с. Старогнатівка Тельманівського р-ну Донецької обл.
Мед квітково-соняшниковий	150711	с. Мирне Тельманівського р-ну Донецької обл.
Мед квітково-соняшниковий	180711	с. Андріївка Тельманівського р-ну, Донецької обл.
Мед квітково-липовий	150711	с. Садове Шахтарського р-ну Донецької обл.
Мед квітково-липовий	270611	с-ще Нове Краснолиманського р-ну Донецької обл.
Мед квітковий	040710	смт. Вороніж Шосткинського р-ну Сумської обл.
Мед квітковий	150710	с. Чорні Лози Шосткинського р-ну Сумської обл.
Мед гречаний	280711	с. Гамаліївка Шосткинського р-ну, Сумської обл.
Мед гречаний	150711	с. Скосогорівка Богодухівського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	100711	смт. Пісочин Харківського р-ну Харківської обл.
Мед коріандрово-акацієвий	050711	с-ще Профінтерн Вовчанського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	150711	с. Червона Гусарівка Балаклійського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	280611	с. Курилівка Куп'янського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	100811	с. Вербівка Балаклійського р-ну Харківської обл.
Мед гречано-соняшниковий	180711	с-ще Раківка Балаклійського р-ну Харківської обл.
Мед липовий	150611	с. Залиман Балаклійського р-ну Харківської обл.
Мед гречаний	100711	с. Чистоводівка Ізюмського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	050811	с. Нові Млини Борзнянського р-ну, Чернігівської обл.
Мед акацієвий	070811	с. Старий Мартинів Галицького р-ну, Івано-Франківської обл.
Мед гречаний	180611	с. Бубнівка Волочиського р-ну Хмельницької обл.
Мед квітковий	150711	с. Кам'яний Міст Первомайського р-ну Миколаївської обл.
Мед квітково-липово-акацієвий	230511	с. Трикратне Вознесенського р-ну Миколаївської обл.
Мед квітково-акацієвий	200610	с. Секретарка Кривоозерського р-ну, Миколаївської обл.
Мед соняшниковий	180710	с. Секретарка, Кривоозерського р-ну Миколаївської обл.
Мед квітково-гірський	100711	с. Лазарівка Сімферопольського р-ну, АР Крим
Мед коріандровий	250711	с. Октябрське Первомайського р-ну, АР Крим
Мед квітковий	200511	с. Вільхівка Горохівського р-ну Волинської обл.
Мед квітково-соняшниковий	120711	с. Заплавка Магдалинівського р-ну Дніпропетровської обл.
Мед квітковий	050612	смт. Вороніж Шосткинського р-ну Сумської обл.
Мед квітковий	290712	с. Скосогорівка Богодухівського р-ну Харківської обл.
Мед квітковий	200512	с. Цвіточне Білогірського р-ну, АР Крим
Мед квітково-липовий	210712	с. Цвіточне Білогірського р-ну, АР Крим
Мед акацієвий	100612	с. Червона Володимирівка Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед липовий	300612	с. Голодьки Хмельницького р-ну Вінницької обл.

Таблиця 1 (продовження)

Назва зразка	Дата збирання	Місце збирання за територіальним призначенням
Мед травневий, квітковий	270512	с. Голодьки Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед гречаний	180812	с. Червона Володимирівка Хмельницького р-ну Вінницької обл.
Мед гречаний	250812	с. Вишпіль Черняхівського р-ну Житомирської обл.
Мед соняшниковий	150712	с. Вишпіль Черняхівського р-ну Житомирської обл.
Мед гречаний	100812	м. Горлівка Горлівського р-ну Донецької обл.
Мед квітковий	200512	с. Нікіфорівка Артемівського р-ну Донецької обл.
Мед соняшниковий	110812	с. Олексіївка Кіровоградського р-ну Кіровоградської обл.
Мед квітково-соняшниковий	250712	с. Онопрієвка Тальневського р-ну Черкаської обл.
Мед гречаний	200812	с. Чистоводівка Богодухівського р-ну Харківської обл.
Мед липово-шавлієвий	150713	с. Скосогорівка Богодухівського р-ну Харківської обл.
Мед еспарцетово-соняшниковий	100712	смт. Краснокутськ Краснокутського р-ну Харківської обл.
Мед липовий	200612	м. Куп'янськ Харківської обл.
Мед квітковий, лісовий	140712	с. Старий Салтів Вовчанського р-ну Харківської обл.
Мед гречано-соняшниковий	200812	с. Чистоводівка Ізюмського р-ну Харківської обл.
Мед липовий	100713	смт. Вороніж Шосткинського р-ну Сумської обл.
Мед квітково-липовий	140712	с. Старий Салтів Вовчанського р-ну Харківської обл.
Мед квітково-соняшниковий	230812	с. Конохи Козівського р-ну Тернопільської обл.
Мед квітково-гречаний	150812	с. Чутово Чутівського р-ну Полтавської обл.
Мед акацієвий	250512	м. Старий Крим, АР Крим
Мед гірський	170712	м. Старий Крим, АР Крим
Мед квітково-гірський	150812	м. Старий Крим, АР Крим

творюють змішуванням з особливими речовинами, що ними виробляються, заготовляють та залишають у медових стільниках для визрівання і досягнення потрібної кондиції [5]. Таким чином, вищезазначені документи описують сировину однаково.

Властивості. ЄФ розглядає мед як в'язку рідину, що може бути частково кристалізованою, від майже білого до темно-коричневого кольору. За вимогами національного стандарту мед може бути без кольору, білий, світло-жовтий,

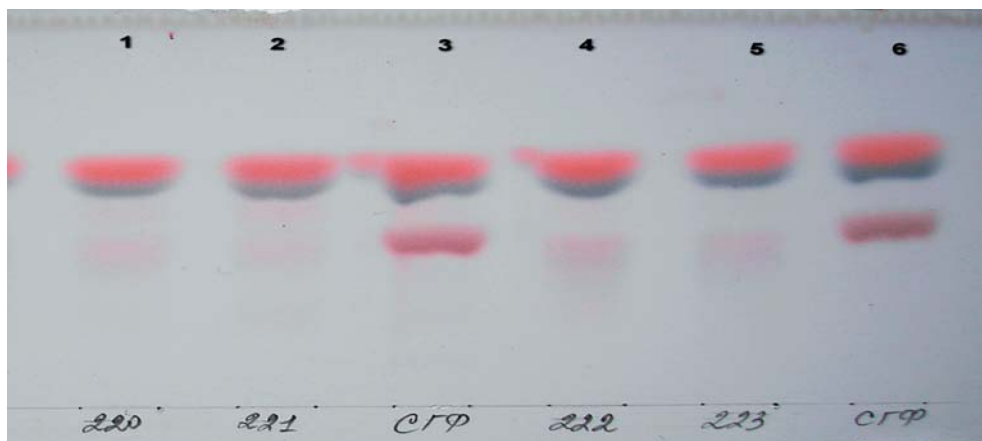
жовтий, темно-жовтий, або темний з різними відтінками [2, 5].

Усі досліджувані зразки відповідали вимогам ЄФ та ДСТУ.

Ідентифікація. Випробування методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) проводили, як описано у монографії «Honey» ЄФ [2].

Наважку 0.6 г меду розчиняли у 50 мл етанолу (30 %, об/об) Р (випробовуваний розчин). Розчин порівняння готували таким чином: 0.5 г ФСЗ ДФУ фруктози, 0.5 г ФСЗ ДФУ глюкози

Рисунок 1



Хроматограми розчинів меду (1, 2, 4, 5) та розчинів стандартних зразків сахарози, глюкози, фруктози (3, 6) (у порядку зростання R_f)

і 0.1 г ФСЗ ДФУ сахарози розчиняли у 100 мл етанолу (30 %, об/об) Р. На хроматографічну пластинку смугами наносили по 5 мкл випробовуваного розчину та розчинів порівняння, пластинки хроматографували в суміші розчинників вода Р – ацетонітрил Р (13:87) тричі, при цьому відстань, яку проходила рухома фаза, становила 15 см від лінії старту. Висушували у теплому повітрі. Для виявлення зон був використаний такий розчин: 2.0 г дифеніламіну Р і 2 мл аніліну Р розчиняли у 100 мл ацетону Р, додавали розчин 850 г/л фосфорної кислоти Р, поки одержаний осад розчиниться знову (близько 15-20 мл). Пластинки переглядали при денному світлі після нагрівання при температурі (100-105) °С протягом 5-10 хв. Типові хроматограми наведено на Рис. 1.

У результаті випробування встановлено, що в усіх зразках на хроматограмах випробовуваного розчину в середній частині проявляється інтенсивна коричнева зона, що відповідає зоні фруктози ($R_f \sim 0,6$), нижче цієї зони – інтенсивна сірувато-синя зона ($R_f \sim 0,58$), що відповідає глюкозі, та 2-3 коричнювато-сірі зони ($R_f \sim 0,4$) нижче зони, що відповідає сахарозі ($R_f \sim 0,44$), на хроматограмі розчину порівняння. На рівні

зони, що відповідає сахарозі на хроматограмі розчину порівняння, відповідних зон на хроматограмах випробовуваних розчинів не виявлено, що є доказом відсутності додавання цукру.

Випробування

Визначення показника заломлення експериментальних зразків меду проводили при температурі (20±0.5) °С за довжини хвилі лінії D спектра натрію ($\lambda = 589.3$ нм) [9, с. 47-49].

Для проведення даного аналізу 100.0 г субстанції гомогенізували і переносили в колбу, яку щільно закривали й утримували на водяній бані при температурі (50±0.2) °С до повного розчинення кристалів цукру. Одержаний розчин охолоджували до температури 20 °С і регомогенізували. Відразу після регомогенізації поверхню призми рефрактометра рівномірно покривали випробовуваним зразком. Показник заломлення n_D^{20} вимірювали через 2 хв та використовували середнє значення двох вимірювань [2]. Результати визначення показника заломлення зразків меду натурального наведено в Табл. 2.

Дані Табл. 2 свідчать про те, що значення n_D^{20} експериментальних зразків меду натурально-

Таблиця 2

Результати визначення показника заломлення в експериментальних зразках меду натурального

№ з/п	Показник заломлення, n_D^{20}	№ з/п	Показник заломлення, n_D^{20}	№ з/п	Показник заломлення, n_D^{20}	№ з/п	Показник заломлення, n_D^{20}
1	1.4956	19	1.4964	37	1.4981	54	1.4975
2	1.4910	20	1.4940	38	1.4927	55	1.4923
3	1.4898	21	1.4945	39	1.4941	56	1.5050
4	1.4878	22	1.4970	40	1.4986	57	1.4880
5	1.4950	23	1.4952	41	1.4943	58	1.4795**
6	1.4942	24	1.4936	42	1.4939	59	1.4963
7	1.4871	25	1.4861	43	1.4994	60	1.5020
8	1.4920	26	1.4920	44	1.4963	61	1.4950
9	1.4869	27	1.4900	45	1.4978	62	1.4940
10	1.4961	28	1.4850*	46	1.4946	63	1.4980
11	1.4909	29	1.4941	47	1.4954	64	1.4905
12	1.4950	30	1.4975	48	1.4800**	65	1.4989
13	1.4870	31	1.4890	49	1.4805**	66	1.4979
14	1.4867*	32	1.4841*	50	1.4888	67	1.4990
15	1.4890	33	1.4821**	51	1.4880	68	1.5145
16	1.4952	34	1.4976	52	1.4853*	69	1.5450
17	1.4927	35	1.4868*	53	1.4970	70	1.5050
18	1.4942	36	1.4896				
Стандартне відхилення, SD			0.0588				
Відносне стандартне відхилення, RSD, %			3.9156				

Примітка:

* — зразки, які не відповідають вимогам монографії ЄФ «Honey» за значенням показника заломлення та, відповідно, за вмістом води.

** — зразки, які не відповідають вимогам монографії ЄФ «Honey» та ДСТУ 4497:2005 за значенням показника заломлення та, відповідно, за вмістом води.

Таблиця 3

Результати визначення показника заломлення та вмісту води в експериментальних зразках меду натурального, зібраного в різних областях / регіонах України

Область/ регіон	Кількість зразків	Мінімальне значення показника заломлення	Максималь- не значення показника заломлення	Середнє значення показника заломлен- ня	Мінімальне значення вмісту води, %, м/м, ек- вівалентне значенню показника заломлення	Максималь- не значення вмісту води, %, м/м, ек- вівалентне значенню показника заломлення	Середнє значення вмісту води, %, м/м, ек- вівалентне значенню показника заломлення
АР Крим	7	1.4943	1.5450	1.5068	11.9	17.0	15.08
Вінницька	9	1.4800	1.4956	1.4876	16.4	22.6	14.88
Волинська	1	1.4939	1.4939	1.4939	17.0	17.0	14.95
Дніпропетров- ська	1	1.4994	1.4994	1.4994	15.0	15.0	15.00
Донецька	7	1.4923	1.4975	1.4946	15.6	17.8	14.95
Житомирська	4	1.4853	1.4970	1.4921	15.8	20.6	14.93
Запорізька	2	1.4871	1.4942	1.4907	17.0	19.8	14.91
Івано- Франківська	1	1.4976	1.4976	1.4976	15.6	15.6	14.98
Київська	2	1.4867	1.4870	1.4869	19.8	20.0	14.88
Кіровоградська	1	1.5050	1.5050	1.5050	12.6	12.6	15.06
Миколаївська	4	1.4896	1.4981	1.4936	15.5	18.8	14.94
Полтавська	1	1.4990	1.4990	1.4990	15.0	15.0	15.00
Сумська	5	1.4905	1.4970	1.4947	15.8	18.4	14.95
Тернопільська	2	1.4890	1.4979	1.4934	15.6	19,0	14.94
Харківська	17	1.4795	1.5020	1.4925	13.8	22.6	14.93
Хмельницька	1	1.4868	1.4868	1.4868	19.8	19.8	14.88
Черкаська	4	1.4869	1.4961	1.4908	16.2	19.8	14.92
Чернігівська	1	1.4821	1.4821	1.4821	21.8	21.8	14.83
Стандартне відхилення, SD				0.0062	Стандартне відхилення, SD		0.0062
Відносне стандартне відхилення, RSD, %				0.4184	Відносне стандартне відхилення, RSD, %		0.4184

го знаходяться в межах від 1.5450 до 1.4795, що відповідає вмісту води від 11.9 до 22.6 %.

Оскільки ЄФ регламентує значення n_D^{20} для меду не менше 1.4870, що є еквівалентним максимальному вмісту води (20 %), то є очевидним, що 9 зразків із 70 – № 14, 28, 32, 33, 35, 48, 49, 52, 58 – не відповідають вимогам монографії ЄФ за значенням показника заломлення та, відповідно, за вмістом води, який перевищує максимальну норму та становить: № 14 ($n_D^{20} = 1.4867$) – 20.0 %, № 28 ($n_D^{20} = 1.4850$) – 20.6 %, № 32 ($n_D^{20} = 1.4841$) – 21 %, № 33 ($n_D^{20} = 1.4821$) – 21.8 %, № 35 ($n_D^{20} = 1.4868$) – близько 20.0 %, № 48 ($n_D^{20} = 1.4800$) – 22.6 %, № 49 ($n_D^{20} = 1.4805$) – 22.4 %, № 52 ($n_D^{20} = 1.4853$) – 20.6%, № 58 ($n_D^{20} = 1.4795$) – 22.6 %.

Решта зразків мають задовільні показники в межах відповідної норми згідно з монографією ЄФ, оскільки значення показника заломлення в них становило не менше 1.4870. Однак, враховуючи вимоги національного стандарту, можна зробити висновок, що за показником залом-

лення, на відміну від вимог ЄФ, лише 4 зразки (№ 33, 48, 49, 58) не відповідають нормам ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний», оскільки даний документ передбачає мінімальне значення показника заломлення $n_D^{20} = 1.4840$, що еквівалентно максимальному вмісту води 21 % [1, 5].

У Табл. 3 наведено значення n_D^{20} та значення вмісту води (% м/м) для експериментальних зразків меду з кожної області, що дає можливість об'єктивно оцінити та провести контроль якості випробування на вміст води у зразках меду з різних регіонів України.

Аналіз даних Табл. 4 показує, що, залежно від територіального походження, середнє значення вмісту води у досліджуваних зразках меду натурального становить: для зразків з центральної частини України – від 12.6 до 18.0 %; для зразків з північної частини України – від 19.9 % до 21.8 %; для зразків з південної – від 14.45 % до 17.2 %; для зразків із західної частини – від 15.6 % до 17.3 %; для зразків зі східної частини – близько 15 %; для зразків з південно-

західної частини — близько 19.5 %; для зразків з південно-східної частини — від 16.7 % до 18.4 %; для зразків з північно-західної частини — від 17 % до 18.2 %; для зразків з північно-східної частини — від 17.1 до 18.2 %. Найменше значення вмісту води (12.6 %) визначено у зразку № 56 з Кіровоградської обл., а найбільше (22.6 %) — у зразках № 48 з Вінницької обл. та № 58 з Харківської обл.

Питому електропровідність зразків меду натурального визначали із використанням даних щодо показника заломлення та відповідного вмісту води в субстанції, наведених у Табл. 2051.-1 ЄФ [2]. Використовуючи наведені дані, кількість субстанції, еквівалентну 20.0 г сухого залишку меду, розчиняли у воді *P*, доводили до об'єму 100.0 мл та вимірювали питому електропровідність [10, с. 22-23]. Результати визначення питомої електропровідності досліджуваних

зразків меду наведені в Табл. 5. Можна бачити, що значення питомої електропровідності випробовуваних зразків меду коливається в межах від 129.9 мкСм/см⁻¹ до 481 мкСм/см⁻¹ та не перевищує максимальне значення цього показника (800 мкСм/см⁻¹) відповідно до вимог ЄФ [2]. Стандартне відхилення та відносне стандартне відхилення не розраховували з огляду на те, що всі результати знаходилися значно нижче допустимого рівня однобічного нормування.

Оптичне обертання експериментальних зразків меду натурального визначали відповідно до вимог ДФУ [9, с. 49-50]. Значення показника заломлення та вмісту води брали з Табл. 2051.-1 ЄФ [2]. Наважку меду, еквівалентну 20.0 г сухого залишку меду, розчиняли у воді *P* і доводили об'єм розчину до 50.0 мл. До одержаного розчину додавали 0.2 мл *аміаку розчину концен-*

Таблиця 4

Результати визначення показника заломлення та вмісту води в експериментальних зразках меду натурального залежно від територіального походження

Область / регіон	Кількість зразків	Мінімальне значення показника заломлення	Максимальне значення показника заломлення	Середнє значення показника заломлення	Мінімальне значення вмісту води, %, м/м	Максимальне значення вмісту води, %, м/м	Середнє значення вмісту води, %, м/м
Центральна частина України							
Кіровоградська	1	1.5050	1.5050	1.5050	12.6	12.6	12.6
Полтавська	1	1.4990	1.4990	1.4990	15.0	15.0	15.0
Хмельницька	1	1.4868	1.4868	1.4868	19.8	19.8	19.8
Черкаська	4	1.4869	1.4961	1.4917	16.2	19.8	18.0
Північна частина України							
Київська	2	1.4867	1.4870	1.4869	19.8	20.0	19.9
Чернігівська	1	1.4821	1.4821	1.4821	21.8	21.8	21.8
Південна частина України							
АР Крим	7	1.4943	1.5450	1.5196	11.9	17.0	14.45
Миколаївська	4	1.4896	1.4981	1.4936	15.5	18.8	17.2
Західна частина України							
Івано-Франківська	1	1.4976	1.4976	1.4976	15.6	15.6	15.6
Тернопільська	2	1.4890	1.4979	1.4934	15.6	19.0	17.3
Східна частина України							
Дніпропетровська	1	1.4994	1.4994	1.4994	15.0	15.0	15.0
Південно-західна частина України							
Вінницька	9	1.4800	1.4956	1.4878	16.4	22.6	19.5
Південно-східна частина України							
Донецька	7	1.4923	1.4975	1.4949	15.6	17.8	16.7
Запорізька	2	1.4871	1.4942	1.4907	17.0	19.8	18.4
Північно-західна частина України							
Волинська	1	1.4939	1.4939	1.4939	17.0	17.0	17.0
Житомирська	4	1.4853	1.4970	1.4910	15.8	20.6	18.2
Північно-східна частина України							
Сумська	5	1.4905	1.4970	1.4937	15.8	18.4	17.1
Харківська	17	1.4795	1.5020	1.4907	13.8	22.6	18.2

трованого Р і доводили об'єм розчину водою Р до 100.0 мл. При необхідності розчин знебарвлювали вугіллям активованим Р. Вимірювання проводили за довжини хвилі 546.1 нм.

Питоме оптичне обертання $[\alpha]_D^{20}$ випробовуваного розчину розраховували за формулою:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000 \times \alpha}{l \times c \times 1.17543},$$

де:

- α — кут обертання розчину, у градусах;
- c — концентрація розчину, у грамах на літр;
- l — довжина кювети, у дециметрах;
- 1.17543 — коефіцієнт перерахунку.

З результатів, представлених у Табл. 6-7, можна бачити, що значення оптичного обертання досліджуваних зразків меду коливається в межах від -20.6° до -3.8° та не перевищує максимально допустиме значення відповідно до вимог ЄФ ($+ 0.6^\circ$).

Аналіз даних Табл. 7 свідчить про те, що мінімальне значення оптичного обертання спостерігалось у деяких зразках переважно з північно-східного (-20.6 — Сумська обл., -18.6 — Харківська обл.) та південно-східного (-17.6 — Донецька обл., Запорізька обл.) регіонів, а максимальне — з північно-західного регіону (-3.8 — Житомирська обл.). Середнє значення оптичного обертання у досліджуваних зразках меду варіюється в межах від -6.5

до -15.7 , відносно стандартне відхилення становить 21.6134.

У Табл. 8 наведені середні значення результатів аналізу показника заломлення, вмісту води та оптичного обертання досліджуваних зразків меду натурального, зібраних на території різних регіонів України. Як можна бачити з цих таблиць, отримані результати коливаються в залежності від сорту, виду, періоду та місця збирання меду натурального.

Наприклад, найбільш високі значення показника заломлення спостерігаються у зразках з південних (1.5196 — АР Крим) та центральних (1.5050 — Кіровоградська обл., 1.4990 — Полтавська обл.) регіонів, які представлені квітковим, коріандровим, квітково-липовим, липовим та гірським сортами меду. Деяко менше значення n_D^{20} належить зразкам зі сходу (1.4994 — Дніпропетровська обл.) та заходу (1.4976 — Івано-Франківська) України, які відповідно представлені квітково-соняшниковим та акацієвим сортами меду. Далі, майже на однаковому рівні в межах 1.4949-1.4934 знаходяться значення показника заломлення для зразків з південно-східного (1.4949 — Донецька обл.), північно-західного (1.4939 — Волинська обл.), північно-східного (1.4937 — Сумська обл.), південного (1.4936 — Миколаївська обл.) та західного (1.4934 — Тернопільська обл.) регіонів. Серед зразків меду з цих регіонів є як монофлорні, так і поліфлорні сорти: квітковий, акацієвий, соняшниковий, липовий, гречаний, квітково-

Таблиця 5

Результати визначення питомої електропровідності в експериментальних зразках меду натурального

№ з/п	Питома електропровідність, мкСм/см ⁻¹	№ з/п	Питома електропровідність, мкСм/см ⁻¹	№ з/п	Питома електропровідність, мкСм/см ⁻¹	№ з/п	Питома електропровідність, мкСм/см ⁻¹
1	183.7	19	312.0	37	129.9	54	312.0
2	464.0	20	275.0	38	315.0	55	278.0
3	324.0	21	265.0	39	257.0	56	265.0
4	257.0	22	320.0	40	347.0	57	253.0
5	130.6	23	262.0	41	289.0	58	318.0
6	153.7	24	282.0	42	226.0	59	282.0
7	271.0	25	320.0	43	282.0	60	249.0
8	146.4	26	210.0	44	275.0	61	318.5
9	244.0	27	251.0	45	345.0	62	275.2
10	135.7	28	286.0	46	248.0	63	296.0
11	321.0	29	287.0	47	267.0	64	462.3
12	246.0	30	254.0	48	132.0	65	283.5
13	363.0	31	481.0	49	284.0	66	279.7
14	298.0	32	282.0	50	268.0	67	318.0
15	150.7	33	336.0	51	293.0	68	163.0
16	244.0	34	239.0	52	317.0	69	352.0
17	295.0	35	314.0	53	264.0	70	340.5
18	284.0	36	258.0				

акацієвий, квітково-соняшниковий, квітково-липовий, квітково-липово-акацієвий. Низькі значення показника заломлення належать зразкам з центральної, північно-західної, південно-східної, північно-східної, південно-західної та

східної частини України: 1.4917 — Черкаська обл., 1.4910 — Житомирська обл., 1.4907 — Запорізька та Харківська обл., 1.4878 — Вінницька обл., 1.4869 — Київська обл., 1.4868 — Хмельницька обл. та 1.4821 — Чернігівська обл.

Таблиця 6

Результати визначення оптичного обертання в експериментальних зразках меду натурального

№ з/п	Оптичне обертання, град.	№ з/п	Оптичне обертання, град.	№ з/п	Оптичне обертання, град.	№ з/п	Оптичне обертання, град.
1	-12.6	19	-16.1	37	-12.1	54	-12.4
2	-11.3	20	-13.4	38	-12.3	55	-17.6
3	-13.8	21	-17.2	39	-11.5	56	-12.3
4	-5.7	22	-13.8	40	-13.5	57	-15.8
5	-13.1	23	-20.6	41	-10.2	58	-6.7
6	-13.8	24	-16.7	42	-8.8	59	-13.6
7	-17.6	25	-12.4	43	-15.7	60	-15.5
8	-11.2	26	-5.6	44	-10.7	61	-9.9
9	-16.2	27	-18.2	45	-8.6	62	-17.4
10	-11.8	28	-18.6	46	-9.4	63	-13.2
11	-3.8	29	-17.7	47	-13.5	64	-9.9
12	-9.6	30	-14.4	48	-10.6	65	-14.5
13	-12.6	31	-10.0	49	-9.8	66	-13.7
14	-15.5	32	-8.4	50	-5.9	67	-8.7
15	-10.5	33	-6.5	51	-14.7	68	-12.3
16	-11.9	34	-11.8	52	-15.5	69	-13.4
17	-9.6	35	-8.5	53	-13.2	70	-13.7
18	-16.1	36	-13.0				
Стандартне відхилення, SD				3.4619			
Відносне стандартне відхилення, RSD, %				27.6575			

Таблиця 7

Результати визначення оптичного обертання в експериментальних зразках меду натурального залежно від територіального походження

Область / регіон	Кількість зразків	Середнє значення оптичного обертання, град.
АР Крим	7	-12.1
Вінницька	9	-10.8
Волинська	1	-8.8
Дніпропетровська	1	-15.7
Донецька	7	-13.9
Житомирська	4	-10.5
Запорізька	2	-15.7
Івано-Франківська	1	-11.8
Київська	2	-14
Кіровоградська	1	-12.3
Миколаївська	4	-12.2
Полтавська	1	-8.7
Сумська	5	-14.4
Тернопільська	2	-12
Харківська	17	-13.4
Хмельницька	1	-8.5
Черкаська	4	-13.8
Чернігівська	1	-6.5
Стандартне відхилення SD		2.5828
Відносне стандартне відхилення, RSD, %		21.6134

Оскільки залежність між показником заломлення та вмістом води обернено пропорційна, зменшення значення показника заломлення сигналізує про завищений вміст води. Так, наприклад, квітковий мед з північної України (Чернігівська обл.), який має найменший показник заломлення, не відповідає вимогам ЄФ та ДСТУ 4497:2005 за вмістом води — цей зразок меду містить 21.6 % води.

Така закономірність також підтверджується для зразків з таких регіонів: Хмельницька обл. — 19.8 % води, Київська обл. — 19.9 % води, Вінницька обл. — 19.5 % води. Ці зразки відповідно з центрального, північного та південно-західного регіонів містять менше 20 % води, що також підтверджується низьким значенням показника заломлення. Решта експериментальних зразків вкладаються в норми, наведені у вищезазначених нормативних документах, та є повністю придатними за показниками «Масова частка води» і «Показник заломлення».

Також цікавим є той факт, що найменшу кількість води містять зразки з центральної

частини України: Полтавська обл. — 15.0 % та Кіровоградська обл. — 12.6 %. Можемо зробити обґрунтований висновок, що географічне розташування пасік та місце збору меду також впливає на показники його якості, зокрема такі, як «Показник заломлення» та «Масова частка води».

Що ж стосується отриманих результатів за показником «Оптичне обертання», то з цього приводу привертають увагу центральний, східний та південно-східний регіони, зразки меду з яких мають найменші значення оптичного обертання: — 15.7 — Дніпропетровська обл., — 15.7 — Запорізька обл., — 13.6 — Донецька обл., — 13.1 — Черкаська обл., — 12.3 — Кіровоградська обл.

Найвищі результати визначення кута оптичного обертання (α) спостерігаються на території північно-західного, центрального та північного регіонів, ці результати відповідно становлять: — 8.8 — Волинська обл., — 8.7 — Полтавська обл., — 8.5 — Хмельницька обл. та — 6.5 — Чернігівська обл.

Таблиця 8

Результати визначення показника заломлення, вмісту води та оптичного обертання в експериментальних зразках меду натурального залежно від територіального походження

Область / регіон	Кількість зразків	Середнє значення показника заломлення	Середнє значення вмісту води, %, м/м	Середнє значення оптичного обертання, град.
Центральна частина України				
Кіровоградська	1	1.5050	15.06	— 12.3
Полтавська	1	1.4990	15.00	— 8.7
Хмельницька	1	1.4868	14.88	— 8.5
Черкаська	4	1.4908	14.92	— 13.8
Північна частина України				
Київська	2	1.4869	14.88	— 14
Чернігівська	1	1.4821	14.83	— 6.5
Південна частина України				
АР Крим	7	1.5068	15.08	— 12.1
Миколаївська	4	1.4936	14.94	— 12.2
Західна частина України				
Івано-Франківська	1	1.4976	14.98	— 11.8
Тернопільська	2	1.4934	14.94	— 12
Східна частина України				
Дніпропетровська	1	1.4994	15.00	— 15.7
Південно-західна частина України				
Вінницька	9	1.4876	14.88	— 10.8
Південно-східна частина України				
Донецька	7	1.4946	14.95	— 13.9
Запорізька	2	1.4907	14.91	— 15.7
Північно-західна частина України				
Волинська	1	1.4939	14.95	— 8.8
Житомирська	4	1.4921	14.93	— 10.5
Північно-східна частина України				
Сумська	5	1.4947	14.95	— 14.4
Харківська	17	1.4925	14.93	— 13.4

Зі збільшенням вмісту води та зменшенням значень показника заломлення в експериментальних зразках значення оптичного обертання також зменшується, і навпаки. Особливо чітко це видно на зразках з Хмельницької та Чернігівської обл., які мають найменші значення показника заломлення та найбільший вміст води та, відповідно, найменші значення оптичного обертання (– 8,5, – 6,5).

За результатами отриманих даних фізико-хімічних досліджень (ідентифікація та випробування) можна зробити висновок, що майже всі зразки меду натурального, зібраного в різних регіонах України, відповідають нормам, зазначеним в монографії «Honey» ЄФ та у ДСТУ 4497:2005. Щодо результатів за органолептичними показниками якості меду, то всі досліджені зразки відповідають вимогам даних нормативних документів.

Висновки

1. Проведено аналіз органолептичних та фізико-хімічних показників якості 70 експериментальних зразків різних сортів меду натурального, зібраного в період 2010-2013 рр. в різних областях та регіонах України, на відповідність вимогам монографії «Honey» ЄФ та ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний».

2. За результатами випробування «Ідентифікація» методом ТШХ було встановлено наявність зон фруктози та глюкози та відсутність зони сахарози на хроматограмах випробовуваних зразків, що відповідає вимогам нормативної документації.

3. На підставі проведених фізико-хімічних досліджень з'ясовано, що серед усіх проаналізованих та досліджених зразків 9 зразків не відповідають вимогам ЄФ за показниками «Показник заломлення» і «Масова частка води» та 4 зразки за даними показниками не відповідають вимогам національного стандарту України.

4. Результати визначення питомої електропровідності та оптичного обертання коливаються в межах норми та не перевищують максимальні показники, наведені у відповідних нормативних документах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шпичак О.С., Тихонов О.І., Котов А.Г., Мострянська Н.М. Питання необхідності та можливості розробки проекту монографії «Мед» Державної Фармакопеї України // Фармаком. — 2013. — № 3. — С. 9-17.
2. Honey // European Pharmacopoeia. — 7.0th ed. — Council of Europe. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2009. — P. 2163-2165.
3. British Pharmacopoeia. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances. Honey. — Vol. I & II. — London: The Stationery Office, 2009. — P. 2969-2972.
4. Purified Honey // United States Pharmacopoeia: USP 30 - NF 25. — Rockville, 2007. — P. 1132.

5. ДСТУ 4497:2005. Мед натуральний. Технічні умови. — Київ: Держспоживстандарт України, 2007. — 21 с.
6. ГОСТ Р 52451-2005. Мёды монофлорные. Технические условия. — Москва: Стандартинформ, 2006. — 12 с.
7. ГОСТ 19792-2001. Мед натуральний. Технические условия / Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. — Минск: ИПК Издательство стандартов, 2001. — 19 с.
8. ГОСТ 54644-2011. Мед натуральний. Технические условия / Национальный стандарт Российской Федерации // Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. — Москва: Стандартинформ, 2012. — 16 с.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РИРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

УДК 638.16

Резюме

Шпичак О.С., Тихонов А.И., Котов А.Г., Котова Э.Э., Мострянская Н.М.

Национальный фармацевтический университет
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Разработка проекта монографии «Мед» Государственной Фармакопеи Украины

Проведен обзор литературных источников и нормативной документации с целью разработки монографии «Мед» Государственной фармакопеи Украины (ГФУ). Для введения в ГФУ монографии «Мед» были оценены методики контроля качества, гармонизированные с требованиями монографии «Honey» Европейской Фармакопеи (ЕФ), например идентификация методом тонкослойной хроматографии с использованием доступных национальных стандартов, методики определения показателя преломления, удельной электропроводности и оптического вращения. Экспериментальные образцы были собраны на пасеках, расположенных в различных регионах Украины, и проанализированы с использованием современного лабораторного оборудования. Анализ проводили в соответствии с методиками ЕФ 7.0 и ДСТУ 4497:2005. Результаты оценивали с целью выявления тенденций, специфических для меда, собранного в конкретной части страны. Анализ показал, что большинство образцов отвечают требованиям ЕФ. Девять образцов не соответствуют требованиям ЕФ и четыре образца не отвечают требованиям национального стандарта Украины по показателю преломления и содержанию воды.

Установлено, что требования ДСТУ 4497:2005 и монографии ЕФ «Honey» могут быть использованы для контроля качества меда в Украине, а предложенные нами требования к отечественному меду могут быть введены в ГФУ.

Ключевые слова: мед натуральний, Европейская Фармакопея, контроль качества, гармонизация требований, испытания, Государственная Фармакопея Украины.

UDC 638.16

Summary

Shpychak O.S., Tikhonov A.I., Kotov A.G., Kotova E.E., Mostrianska N.M.

National University of Pharmacy, Kharkiv
State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines», Kharkiv

Development of the monograph draft «Honey» of the State Pharmacopoeia of Ukraine

The literature review of normative documentation was carried for elaboration of the monograph of State Pharmacopoeia

of Ukraine «Honey». For implementation into the monograph of State Pharmacopoeia of Ukraine «Honey» methods of control harmonized with the requirements of EP monograph were evaluated, such as TLC identification with the use of national standards available, methods for determining the index of refraction (n_D^{20}), specific conductivity (k) and optical rotation angle (α). Samples were collected from apiaries situated in different regions of Ukraine. Appearance was controlled visually, identification was controlled by thin-layer chromatography, the index of refraction, specific conductivity and optical rotation angle were defined experimentally using modern equipment. Analysis was carried out in compliance with methods of European Pharmacopoeia 7.0 and DSTU 4497:2005. The results were evaluated to identify trends specific for honey collected from the concrete part of the country.

The analysis showed that most of the samples meet the requirements of the European Pharmacopoeia. 9 samples didn't meet the requirements of European Pharmacopoeia as per refraction index and water content. 4 samples didn't meet the requirements of national standard of Ukraine.

Requirements of national standard of Ukraine and European Pharmacopoeia monograph can be used for quality control of honey in Ukraine. Proposed requirements can be implemented to the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Keywords: natural honey, European Pharmacopoeia, quality control, harmonization of requirements, tests, State Pharmacopoeia of Ukraine.

Шпичак Олег Сергійович (н. 1977). Закінчив Національну фармацевтичну академію України (2000). К.фарм.н (2005). Доцент кафедри аптечної технології ліків ім. Д.П. Сала НФаУ.

Тихонов Олександр Іванович (н. 1938). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1961). Д.фарм.н. (1983). Професор кафедри технології парфумерно-косметичних засобів НФаУ.

Котов Андрій Георгійович. Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). Д.фарм.н. (2014). Головний наук. співр. (2014). Керівник наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина» відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Котова Еліна Едуардівна. Закінчила Харківський державний університет (1983). К.фарм.н. (2005). Провідний наук. співр. відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Мострянська Наталія Михайлівна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2011). Мол. наук. співр. відділу валідації та стандартних зразків ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Фітохімічні дослідження

УДК 615.11

Котова Е.Е., Котов А.Г., Морозов Р.В.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Порівняльний аналіз фармакопейних методик визначення вмісту ефірної олії в лікарській рослинній сировині

Проведено порівняльний аналіз методик визначення вмісту ефірної олії у лікарській рослинній сировині (ЛРС) провідних фармакопей світу, а саме методик ГФ XI, Державної Фармакопеї України (ДФУ) та Фармакопеї Польщі (ФП). Відзначено відмінності в ціні поділки градуйованої трубки, конструкційні особливості конденсуючих систем приладів (холодильників).

Встановлена відмінність у всіх методиках щодо використання розчинника для поглинання ефірної олії. Визначено, що у методиці ФП враховуються максимально всі можливі втрати ксилолу при перегонці, ця методика відрізняється вилогами до підготовки приладу до випробування.

У результаті вивчено залежність кількісного вмісту ефірної олії від конструкції приладів ДФУ та ФП. Запропоновано до загальної статті ДФУ 2.8.12. «Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження» розробити національну частину, до якої включити опис приладу ФП.

Ключові слова: Державна Фармакопея України, фармакопейні методики, визначення вмісту ефірної олії, лікарська рослинна сировина.

Стандартизація лікарської рослинної сировини (ЛРС) та препаратів на її основі за кількісним вмістом ефірної олії (ЕО) є одним із найпоширеніших кількісних методів оцінювання якості ЛРС. Так, серед 170 монографій на ЛРС, що включені до Державної Фармакопеї України 2 видання (ДФУ 2.0), 29 монографій містять кількісну регламентацію в сировині саме вмісту ЕО, причому в 15 з цих монографій (тобто в половині) вміст ЕО — це єдиний кількісний по-

казник якості (Табл. 1).

Враховуючи це, зрозумілою є актуальність пошуку методик кількісного визначення ЕО, які дозволяють одержувати достовірні та відтворювані результати. Для вирішення цієї задачі було здійснено аналіз методик, описаних в провідних фармакопеях світу, для вибору найбільш доцільної методики, яка дозволяє об'єктивно оцінювати кількісний вміст ЕО в ЛРС.

Таблиця 1

Перелік ЛРС, що стандартизується за кількісним вмістом ефірної олії, монографії на яку включені до ДФУ 2.0

№	Найменування ЛРС	Вимоги ЄФ / ДФУ (метод / регламентація)	Національні вимоги ДФУ (метод / регламентація)
1.	Анісу плоди	ЕО — не менше 20 мл/кг. Метод ВЕРХ. Не менше 0.3 % кумарину.	—
2.	Валеріани корені	ЕО — не менше 4 мл/кг. Метод ВЕРХ. Суми сесквітерпенових кислот — не менше 0.17 %.	ЕО — не менше 3 мл/кг. Метод ВЕРХ. Суми сесквітерпенових кислот — не менше 0.10 %.
3.	Гадючник	ЕО — не менше 1 мл/кг. Метод ВЕРХ. Не менше 1.2 % гарпагозиду.	—
4.	Гвоздика	ЕО — не менше 150 мл/кг.	—
5.	Деревій	ЕО — не менше 2 мл/кг. Метод СФ. Не менше 0.02 % проазуленів.	Метод СФ. Не менше 2 % суми поліфенолів.
6.	Дягелю лікарського корені	ЕО — не менше 2 мл/кг.	—
7.	Евкالیпта листя	ЕО — не менше 15 мл/кг.	ЕО — не менше 10 мл/кг.
8.	Зірчастий аніс	ЕО — не менше 70 мл/кг. Метод ГХ. Не менше 86 % транс-анетолу.	—
9.	Імбир	ЕО — не менше 15 мл/кг.	—
10.	Коричник	ЕО — не менше 12 мл/кг.	—
11.	Коріандр	ЕО — не менше 3 мл/кг.	—
12.	Куркума яванська	ЕО — не менше 50 мл/кг. Метод СФ. Не менше 1.0 % похідних дицинамоїлметану.	—
13.	Лаванди квітки	ЕО — не менше 13 мл/кг. Метод ГХ. Інші види лаванди.	—
14.	Лимонної вербени листя	Метод ВЕРХ. Не менше 2.5 % арбутину. ЕО — не менше 3 мл/кг.	—
15.	Любистку корені	ЕО — не менше 4 мл/кг.	—
16.	Материнка	ЕО — не менше 25 мл/кг. Метод ГХ. Не менше 60 % суми тимолу та карвакролу.	ЕО — не менше 1 мл/кг. Метод СФ. Не менше 1.5 % суми флавоноїдів.
17.	М'яти перцевої листя	ЕО — не менше 12 мл/кг.	—
18.	Полин гіркий	ЕО — не менше 2 мл/кг.	ЕО — не менше 1.5 мл/кг. Екстрактивні речовини — не менше 20 %.
19.	Померанця гіркого екзокарпій і мезокарпій	ЕО — не менше 20 мл/кг.	—
20.	Римської ромашки квітки	ЕО — не менше 7 мл/кг.	—
21.	Розмарину листя	ЕО — не менше 12 мл/кг. Метод СФ. Не менше 3 % суми гідроксикоричних похідних.	—
22.	Ромашки квітки	ЕО — не менше 4 мл/кг. Метод ВЕРХ. Не менше 0.25 % апігенін-7-глюкозиду.	ЕО — не менше 3 мл/кг. Метод СФ. Не менше 1 % флавоноїдів.
23.	Фенхель гіркий	ЕО — не менше 40 мл/кг. Метод ГХ. Не менше 60 % анетолу і 15 % фенхону в ЕО.	—

Таблиця 1 (продовження)

№	Найменування ЛРС	Вимоги ЄФ / ДФУ (метод / регламентація)	Національні вимоги ДФУ (метод / регламентація)
24.	Фенхель солодкий	ЕО — не менше 20 мл/кг. Метод ГХ. Не менше 80 % анетолу в ЕО.	—
25.	Чебрець	ЕО — не менше 12 мл/кг. Метод ГХ. Не менше 40 % суми тимолу та карвакролу.	—
26.	Чебрець повзучий	ЕО — не менше 3.0 мл/кг.	ЕО — не менше 1.5 мл/кг.
27.	Шавлії лікарської листя	ЕО — не менше 15 мл/кг.	ЕО — не менше 8 мл/кг.
28.	Шавлії трилопатевої листя	ЕО — не менше 18 мл/кг.	—
29.	Яловець	ЕО — не менше 10 мл/кг.	—

Примітки:

ЕО — ефірна олія;
 ВЕРХ — вискоэффективна рідинна хроматографія;
 СФ — спектрофотометрія;
 ГХ — газова хроматографія.

Серед фармакопейних методик визначення вмісту ЕО в ЛРС, які засновані на перегонці ЕО з водяною парою, найбільш застосовні такі методики: Європейської Фармакопеї (ЄФ) [1], Британської Фармакопеї (БФ) [2], Фармакопеї США (Ф. США) [3], Державної Фармакопеї СРСР 11 видання (ГФ XI) [4], ДФУ [5], Фармакопеї Польщі (ФП) [6]. Враховуючи, що ЄФ, БФ та ДФУ гармонізовані і мають однакові методики визначення ЕО, а у Ф. США у статті <561> «Articles of botanical origin» (розділ «Volatile Oil Determination») відсутня детальна характеристика приладу і методики (надано рисунок уловлювача для леткої олії, що легша за воду або важча за воду), то порівняння доцільно проводити за методиками ГФ XI, ДФУ та ФП. В Табл. 2 наведено основні параметри даних методик.

Раніше нами було обговорено деякі питання використання методики визначення ефірної олії за ЄФ (у подальшому гармонізовано ДФУ) із використанням приладу за ГФ XI. Було зроблено висновки про можливість використання інших приладів із ціною поділки градуйованої трубки 0.02 мл та конструкційними особливостями (пряма трубка холодильника) [7].

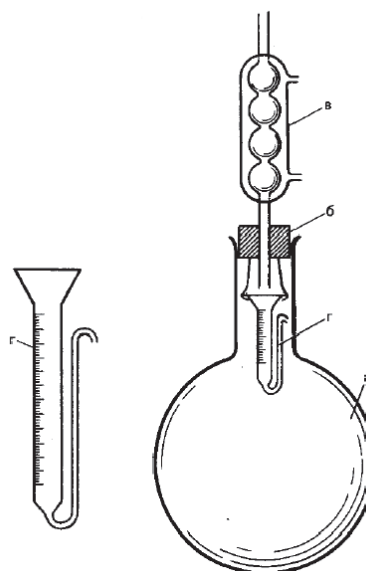
Методики визначення ЕО та їх апаратурне забезпечення

Методики ГФ XI. У ГФ XI в загальній статті «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье» описано 4 методи визначення.

1-й метод (метод Гінзбурга). Для визначення використовують прилад, зображений на Рис. 1. Наважку здрібненої сировини поміщають у широкогорлу колбу (а) місткістю 1000 мл, додають

300 мл води і закривають резиноювою пробкою (б), що з'єднана зі зворотним холодильником (в). До пробки знизу приєднаний градуйований приймач (г), що вільно розташований в горловині колби, не торкаючись стінок, з ціною поділки 0.025 мл.

Рисунок 1



Прилад для визначення вмісту ефірних олій за методом 1, ГФ XI

Колбу з вмістом нагрівають і кип'ятять протягом часу, зазначеного в нормативній документації на конкретну ЛРС. Об'єм олії в градуйованому приймачі вимірюють після закінчення перегонки та охолодження приладу до кімнатної температури.

2-й метод (метод Клевенджера). Для визначення використовують прилад, зображений на Рис. 2. Він складається із круглодонної колби (а) місткістю 1000 мл, паровідвідної вигнутої трубки (б), холодильника (в), градуйованої трубки приймача (г), що закінчується знизу краном (д) і зливною трубкою (е). У верхній частині приймача є розширення (ж) з бічною

трубкою (з), що необхідна для внесення розчинника ЕО у приймач. Для заповнення приладу водою використовується резинова трубка (и) та воронка (к). Градуйована трубка має ціну поділки 0.02 мл.

Методика полягає в наступному: наважку здрібненої сировини поміщають у колбу, додають 300 мл води, колбу з'єднують з паровідвід-

Таблиця 2

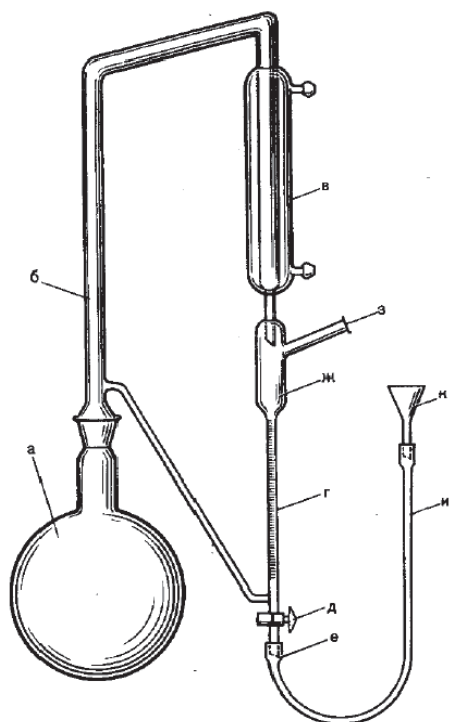
Основні параметри фармакопейних методик визначення ефірних олій

	ГФ XI				ДФУ	ФП	
	Метод 1 ГФ XI (Гінзбургера)	Метод 2 ГФ XI (Клевенджера)	Метод 3 ГФ XI (Клевенджера)	Метод 4 ГФ XI		Метод 1	Метод 2
Схема приладу	Рис. 1	Рис. 2	Рис. 2	Рис. 3	Рис. 4	Рис. 5	Рис. 5
Ціна поділки градуйованої частини приймача, мл	0.025	0.02	0.02	0.001	0.01	0.01	0.01
Наважка сировини	Зазначена у окремій статті	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Використання поглинаючої рідини, її місце розташування	—	—	0.5 мл декаліну в градуйованій трубці	—	Зазначена кількість ксилолу в градуйованій трубці	—	0.3 мл ксилолу в колбі для перегонки
Кількість пароутворюючої рідини, мл	300 мл води	-/-	-/-	Зазначена кількість води	-/-	-/-	-/-
Попередня перегонка без зразка ЛРС	—	—	—	—	+	—	+
Вимірювання об'єму поглинаючої рідини після попередньої перегонки	—	—	—	—	+	—	—
Час перегонки зі зразком ЛРС, год	Зазначений у окремій статті	-/-	-/-	-/-	-/-	3	3
Швидкість перегонки	—	60-65 крап/хв	-/-	—	Зазначена в окремій монографії	3-4 мл/хв	3-4 мл/хв
Вимірювання об'єму ЕО	У градуйованій трубці	У градуйованій трубці	У градуйованій трубці з вираховуванням об'єму декаліну	У градуйованій трубці	У градуйованій трубці з вираховуванням об'єму ксилолу	У градуйованій трубці	У градуйованій трубці з вираховуванням 0.27 мл ксилолу
Очистка приладу	Перегонка з ацетоном, водою після 6-8 визначень				—	Перегонка з гарячою водою, етанолом 70 % або ацетоном, миють хромовою сумішшю	

ною трубкою та заповнюють водою градуйовану і зливну трубки через кран за допомогою резинової трубки. Колбу з вмістом нагрівають і кип'ять з інтенсивністю 60-65 крапель дистиляту на хвилину протягом часу, зазначеного у нормативній документації на конкретну ЛРС. Через 5 хв після закінчення перегонки відкривають кран, поступово зливають дистилят так, щоб ЕО займала градуйовану частину приймача та через 5 хв вимірюють об'єм ЕО.

3-й метод (метод Клевенджера для сировини, що містить ЕО, які при перегонці утворюють емульсію, легко густіють або мають густину близьку до 1 або більше 1). Для визначення використовують прилад, зображений на Рис. 2. Наважку здрібненої сировини поміщають у колбу, додають 300 мл води, колбу з'єднують з паровідвідною трубкою та заповнюють водою градуйовану і зливну трубки через кран за допомогою резинової трубки. Потім через бокову трубку за допомогою піпетки додають до приймача близько 0.5 мл декаліну та точно вимірюють його об'єм, понижуючи для цього рівень рідини у градуйованій частині приймача. Далі поступають, як зазначено у методі 2 з тією різницею, що об'єм ЕО розраховують за різницею об'єму розчину олії в декаліні та об'єму доданого декаліну.

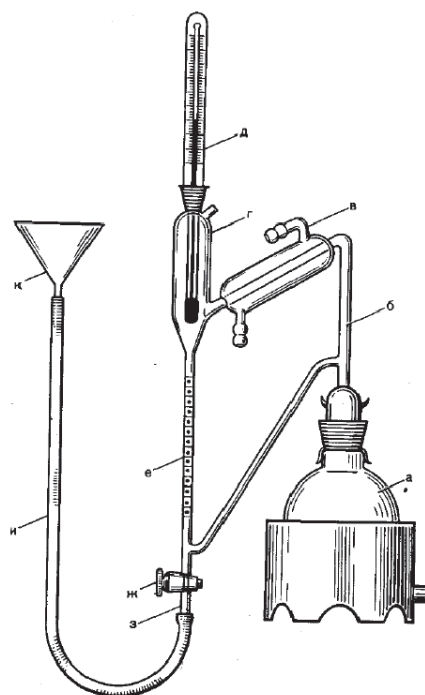
Рисунок 2



Прилад для визначення вмісту ефірних олій за методами 2 та 3, ГФ XI

4-й метод. Для визначення використовують прилад, зображений на Рис. 3. Він складається з круглодонної колби (а) місткістю 1000 мл, паровідвідної трубки (б), холодильника (в), відстійника (г) з термометром до 100 °С (д), ртутна кулька якого знаходиться на рівні отвору холодильника, градуйованої трубки (е), що закінчується знизу краном (ж) і зливною трубкою (з). Для заповнення приладу водою використовується резинова трубка (и) та воронка (к). Градуйована трубка має ціну поділки 0.001 мл.

Рисунок 3



Прилад для визначення вмісту ефірних олій за методом 4, ГФ XI

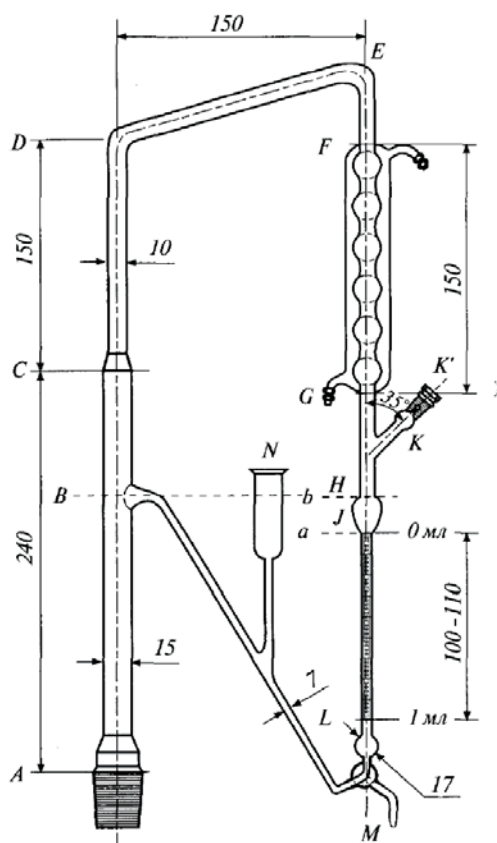
Якщо оцінювати закономірності використання того чи іншого методу визначення ЕО в конкретних статтях ГФ XI, однозначної відповіді щодо причин застосування методів 1-4 немає. В 17 статтях (із 88) ГФ XI, в яких ЛРС стандартизується за кількісним визначенням ЕО, дається посилання на методи 1, 2 та 3 (метод 3 використовується лише в 3 статтях, а метод 4 не описаний в жодній), але відсутній будь-який зв'язок між регламентованим вмістом ЕО і використовуваним методом визначення. Наприклад, для визначення вмісту 0.1-0.2 % ЕО можуть бути зазначені методи 1 або 2 або метод 3, так само як і для вмісту 1-2 % ЕО — метод 1 або 2 або метод 3.

Методика ДФУ. В ДФУ 1.1 в розділі 2.8. «Методи фармакогнозії» міститься загальна стаття 2.8.12. «Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження»,

яка гармонізована з відповідною статтею ЄФ. Відповідно до зазначеної статті, визначення вмісту ЕО, як і в ГФ XI, проводять шляхом перегонки із водяною парою з використанням спеціального приладу (Рис. 4). Прилад складається з: (а) підшої круглдонної скляної колби; (б) конденсуючої частини, яка щільно з'єднується з колбою, різні частини якої сплавлені одна з одною; при цьому:

- у пробці K' є бічний отвір;
- на трубці K з широкою частиною зі шліфованого скла і внутрішнім діаметром 10 мм знаходиться жолоб діаметром близько 1 мм, що суміщається з отвором у пробці;
- місткість грушоподібного розширення J — 3 мл;
- ціна поділки трубки JL — 0.01 мл;
- місткість кулястого розширення L — близько 2 мл;
- M — триходовий кран.

Рисунок 4



Прилад для визначення вмісту ефірних олій за ДФУ

Окремо надається інформація про необхідність використання ретельно очищеного приладу.

Методика визначення полягає в наступному: зазначений об'єм рідини для перегонки помі-

щають у колбу, додають кілька шматочків пористого фарфору і з'єднують із конденсуючою системою, додають *воду P* через наливну лійку N до рівня B . Пробку K' видаляють і додають зазначену кількість *ксилулу P*, використовуючи піпетку таким чином, щоб її кінчик знаходився в нижній частині трубки K . Установлюють пробку K' і переконуються, що жолоб на трубці суміщається з отвором.

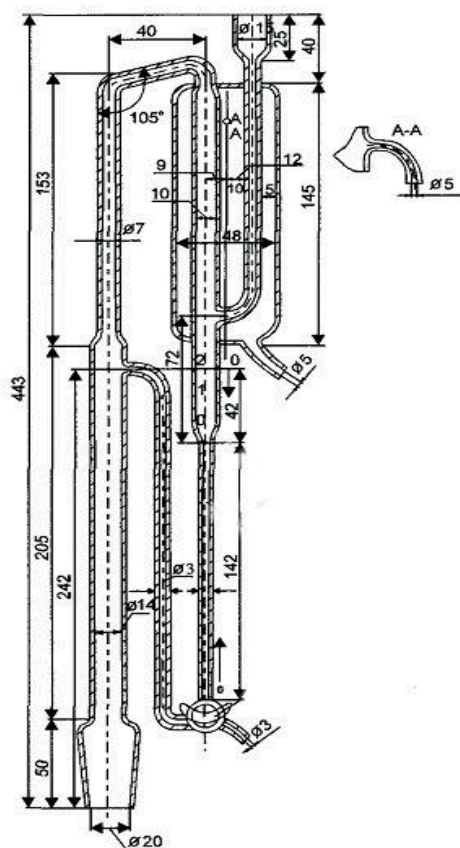
Рідину в колбі нагрівають до кипіння і регулюють швидкість перегонки від 2 мл до 3 мл на хвилину, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Перегонку продовжують 30 хв. Нагрівання припиняють і не менше як через 10 хв визначають об'єм ксилулу, зібраного в градуйованій трубці. Далі зазначену кількість випробовуваного зразка поміщають у колбу і продовжують перегонку, як описано вище, протягом зазначеного часу і при зазначеній швидкості. Нагрівання припиняють, через 10 хв визначають об'єм рідини, зібраної у градуйованій трубці, і віднімають від нього попередньо відзначений об'єм ксилулу. Одержана різниця являє собою кількість ефірних олій з усієї маси випробовуваного зразка.

Методика Фармакопеї Польщі. У Фармакопеї Польщі у загальній статті «Oznaczenie zawartosci olejku» описано 2 методи визначення вмісту ЕО з використанням спеціального приладу Деринга (Рис. 5).

Прилад складається зі скляної колби і конденсуючої системи. Колба круглдонна місткістю 1 л, з шийкою близько 50 мм зі стандартним шліфом. Конденсуюча система складається з дистиляційної колонки, холодильника і приймача, який через триходовий кран і зливну трубку з'єднаний із дистиляційною колонкою, утворюючи замкнутий цикл води. Дистиляційна колонка (внутрішній діаметр близько 14 мм) на висоті 205 мм з'єднана з трубкою з внутрішнім діаметром 7 мм, довжиною 153 мм, яка далі зігнута під кутом 105° у коліно довжиною 40 мм. Трубка спускається вертикально вниз у мантию холодильника, довжина конденсаторної трубки — 145 мм, внутрішній діаметр — 10 мм. Холодильник має висоту 145 мм і діаметр 48 мм.

На відстані 10 мм від мантиї холодильника розташована трубка діаметром 5 мм, яка з'єднана із конденсаторною трубкою, майже під прямим кутом зігнута доверху та проходить паралельно конденсаторній трубці, продовжується над верхньою частиною на 25 мм та залишається відкритою для зовнішнього охолодження. Конденсаторна трубка переходить під холодильником у частково калібрований приймач. Верхня більш широка частина приймача довжиною

Рисунок 5



Прилад для визначення вмісту ефірних олій за Фармакопесю Польщі

42 мм і внутрішнім діаметром 10 мм, із об'ємом 2 мл і ціною поділки 0.1 мл закінчується більш вузькою частиною приймача довжиною 142 мм, внутрішнім діаметром 3 мм, об'ємом 1 мл та ціною поділки 0.01 мл. Трубка приймача закінчується триходовим краном, який з одного боку підключений до зливної трубки з внутрішнім діаметром 3 мм, що з'єднана з дистиляційною колонкою, з іншого боку має коротку відвідну трубку.

Окремо зазначається, що після закінчення аналізу залишки олії видаляють промиванням приладу послідовно гарячою водою, розчином етанолу (760 г/л) або ацетоном. Прилад миють хромовою сумішшю.

Метод 1. Зазначену кількість сировини поміщають у колбу і заливають зазначеним об'ємом води. Спочатку наливають частину води, а після змішування вмісту колби для змивання залишків сировини зі стінок додають залишок води. Колбу приєднують до приладу, заповнюють холодильник водою, включають нагрів і продовжують протягом 3 год, починаючи з моменту закипання вмісту колби і перегонки першої краплі. Інтенсивність нагріву налаштовують таким чином, щоб у приймач переганялось від 3 мл до

4 мл рідини за хвилину. Після закінчення перегонки відключають охолодження, переводять олію у вузьку калібровану частину приймача та через 30 хв вимірюють об'єм.

Метод 2. Зазначену кількість сировини поміщають у колбу і заливають зазначеним об'ємом води, як і в методі 1. Додають у колбу 0.30 мл ксилолу. Колбу з'єднують з приладом, заповнюють холодильник водою, включають нагрів і продовжують протягом 3 год, починаючи з моменту закипання вмісту колби і перегонки першої краплі. Інтенсивність нагріву налаштовують, як і в методі 1. Після закінчення перегонки відключають охолодження, шар ксилолу з олією переводять у вузьку калібровану частину приймача та через 30 хв вимірюють об'єм. Із знайденого результату необхідно відняти (зробити поправку) об'єм ксилолу, приблизно 0.27 мл (з урахуванням втрат ксилолу протягом дистиляції). Поправка має бути визначена експериментально до аналізу для використовуваного приладу.

Таким чином, порівнюючи всі наведені вище методики, можна визначити такі відмінності.

1. Градуирований приймач, в якому проводиться визначення об'єму ЕО, і в методиці ДФУ, і в методиці ФП має ціну поділки 0.01 мл (тобто похибка визначення об'єму — 0.005 мл), в той час як в методиках ГФ XI це 0.02-0.025 мл (окрім методики 4, яка не використовується в жодній статті ГФ XI). Ця відмінність може бути значущою в разі визначення малих кількостей ЕО, тим більше коли використовується метод без добавок декаліну / ксилолу.

2. Не обговорюючи прилади в цілому, треба відмітити конструкційні відмінності конденсуючих систем приладів, і насамперед холодильників. І в ФП, і в методі 3 ГФ XI (прилад якого близький до приладу ДФУ) використовується прямий холодильник, а в ДФУ — кульковий. Це може мати значення, враховуючи що ЕО має властивість «осідати» на поверхні холодильника, і в разі кулькового холодильника ця поверхня значно більша, ніж у випадку прямого.

3. Суттєва відмінність у всіх методиках спостерігається у випадку використання розчинника для поглинання ЕО, а саме декаліну або ксилолу, тобто в тому випадку, коли об'єм ЕО визначають за різницею об'єму розчину олії в декаліні / ксилолі та об'єму доданого декаліну / ксилолу. Як у методі 3 ГФ XI, так і в методиці ДФУ поглинач ефірної олії додають до градуированого приймача, але його об'єм в першому випадку вимірюють до перегонки, а в другому випадку — після перегонки протягом 30 хв, що дозволяє врахувати можливі втрати ксилолу при перегонці.

В методиці ФП ксилол додається в колбу з сировиною до перегонки, переганяється разом з ЕО, а його об'єм, який треба віднімати від загального об'єму ксилочно-олійного розчину, визначається експериментально перед проведенням аналізу. Тобто в даному випадку враховуються максимально всі можливі втрати ксилолу при перегонці, але додається додаткова стадія випробування.

4. Необхідно відмітити також відмінності у вимогах до підготовки приладу до випробування. У ГФ XI це вказівка на необхідність пропускання пари через прилад протягом 15-20 хв перед визначенням та промивку ацетоном та водою після кожних 6-8 визначень. У ДФУ вказано тільки на необхідність використання ретельно очищеного приладу, без пояснення, маючи на увазі загальноприйнятну лабораторну практику. У Фармакопеї Польщі відзначено, що після закінчення аналізу залишки олії видаляють промиванням приладу послідовно гарячою водою, розчином етанолу (760 г/л) або ацетоном, після чого прилад миють хромовою сумішшю.

Враховуючи всі відмінності, цілком зрозуміло, що порівнювати кінцеві результати визначення ЕО на різних приладах немає сенсу. Тому в експериментальній частині даної роботи проводили порівняльний аналіз визначення вмісту ЕО за методикою, описаною у ДФУ, з використанням приладу, описаного у ФП.

В якості об'єктів випробування було вибрано зразки ЛРС, які максимально охоплюють всю різноманітність визначення ЕО, а саме різні регламентовані кількості ЕО, різні методи (без добавок ксилолу і з добавками), різні кількості

доданого ксилолу, різну тривалість перегонки тощо (зразки ЛРС та результати визначення ЕО наведено в Табл. 3). Дані зразки були зібрані у 2012-2013 рр. постачальниками ЛРС і надані для експерименту ПрАТ «Ліктрави».

Порівнюючи дані, наведені в Табл. 3, перш за все треба відмітити в усіх випадках завищені результати вмісту ЕО у разі використання приладу ФП порівняно з приладом ДФУ.

Ця різниця становить від 20 до 30 відсотків відносних, причому в деяких випадках ця різниця має принципове значення — за методом ДФУ ЛРС не відповідає регламентованим вимогам, а за методом ФП — відповідає (приклад — м'яти листя, ромашки квітки, 2 зразка шавлії). Одна з можливих причин цього ймовірно пов'язана саме з конструкцією холодильника, оскільки візуально спостерігалися більш значущі сліди ефірної олії на поверхні шарикового холодильника, ніж на поверхні прямого. Для перевірки даного припущення та вивчення метрологічних характеристик у разі використання двох методів були проведені додаткові дослідження на зразках однієї ЛРС, а саме евкаліпта листі (результати наведено в Табл. 4).

Як видно із даних, наведених в Табл. 4, спостерігається та ж сама тенденція збільшення вмісту ЕО в зразках евкаліпта при визначенні на приладі ФП порівняно з вмістом при визначенні на приладі ДФУ. Невизначеність результатів у разі використання приладу ФП дещо менша, ніж у другому випадку. Треба відмітити, що відтворюваність результатів визначення значною мірою залежала від способу очистки приладу після або перед використанням. Най-

Таблиця 3

Об'єкти випробування та результати визначення вмісту ефірної олії на приладі ДФУ та приладі ФП

ЛРС		Об'єм ксилолу початковий, V ₀ , мл		Об'єм ксилолу + ефірна олія, V, мл		Вміст ефірної олії, %		Регламентация, не менше %	Різниця одержаного вмісту ефірної олії, в %
Назва	№ зразка	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП		
Шавлії листя	1	0.5	0.5	0.66	0.69	0.89	1.1	1.5 — ціла сировина, 1.0 — різана	19
	2	0.5	0.5	0.65	0.68	0.81	0.98		17
	3	0.5	0.5	0.62	0.64	0.59	0.71		17
Чебрецю повзучого трава	1	—	—	0.09	0.13	0.30	0.43	0.3	30
М'яти листя	1	0.5	0.5	0.69	0.73	1.05	1.27	1.2	17
	2	0.5	0.5	0.70	0.75	1.11	1.39		20
Деревію трава	1	0.2	0.2	0.28	0.32	0.41	0.60	0.2	31
Ромашки квітки	1	0.5	0.5	0.57	0.59	0.23	0.30	0.3	23
Материнки трава	1	—	—	0.04	0.05	0.15	0.18	0.1	17

більш прийнятним виявився спосіб, описаний у методиці ФП, а саме: після використання залишки олії видаляють промиванням приладу послідовно гарячою водою, 70 % розчином етанолу або ацетоном, після чого прилад миють хромовою сумішшю.

Для додаткової верифікації приладів був проведений такий експеримент: на двох приладах паралельно проводили перегонку відомої кількості зразка порівняння евкالیптової олії протягом 2 год з додаванням ксилолу в градуйований приймач. Результати наведено в Табл. 5.

При порівнянні даних, наведених в Табл. 5, очевидним є вже встановлений раніше факт отримання завищених результатів вмісту ЕО у разі використання приладу ФП, який нічим іншим, окрім як конструкційними властивостями приладу, не пояснюється.

Таким чином, підсумовуючи проведені дослідження і отримані результати, вважаємо доречним використання приладу ФП для визначення кількісного вмісту ЕО у вітчизняній ЛРС, для чого необхідна розробка національної частини до загальної статті ДФУ 2.8.12. «Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження».

Висновки

Проведено порівняльний аналіз фармакопейних методик визначення вмісту ефірної олії у лікарській рослинній сировині, в результаті якого встановлено, що найбільш обґрунтовані методики наведено в ГФ XI, ДФУ / ЄФ та ФП.

Відзначено відмінності у методиках, що порівнювалися, у конструкційних параметрах приладів та способах підготовки до аналізу.

Вивчено експериментальним шляхом на 7 різних видах ЛРС при використанні методики ДФУ залежність кількісного вмісту ЕО від конструкції приладів ДФУ та ФП; показано різницю одержаного вмісту ЕО та обґрунтовано причину одержаної різниці.

Запропоновано розробити національну частину до загальної статті ДФУ 2.8.12. «Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження», до якої включити опис приладу ФП.

ЛІТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia. Vol. 1-2. — 7th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2011.
2. British Pharmacopoeia. Vol. 1. — London: HMSO, 2001 — 1389 p.
3. The United States Pharmacopoeia — National Formulary. Vol. 1. — USP 33—NF 28. — Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2009. — 1771 p.

Таблиця 4

Результати визначення вмісту ефірної олії у зразках листа евкالیпта прутувидного на різних приладах

Зразки листа евкالیпта	Об'єм ксилолу початковий (визначений після 30 хв перегонки), V ₀ , мл		Об'єм ксилолу + ефірна олія, V, мл		Вміст ефірної олії, %		Різниця, %	Похибка, ε, %	
	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП		Прилад ДФУ	Прилад ФП
1	0.51	0.49	0.67	0.70	1.60	2.10	24	11.1	7.7
1	0.51	0.50	0.68	0.71	1.74	2.05	15		
1	0.51	0.49	0.69	0.72	1.80	2.29	21		
1	0.51	0.51	0.66	0.72	1.55	2.14	28		
2	0.52	0.51	0.66	0.69	1.40	1.80	22	10.3	5.5
2	0.52	0.51	0.67	0.72	1.50	2.05	27		
2	0.52	0.51	0.66	0.72	1.45	2.05	31		
2	0.51	0.51	0.64	0.71	1.35	2.00	32		
2	0.52	0.52	0.66	0.72	1.4	2.00	30		
2	0.53	0.54	0.70	0.75	1.75	2.10	17		

Таблиця 5

Результати верифікації приладів з використанням зразка порівняння евкالیптової олії

Об'єм ксилолу початковий (визначений після 30 хв перегонки), V ₀ , мл		Об'єм зразка порівняння евкالیптової олії, введений до перегінної колби, мл		Об'єм ксилолу + ефірна олія, V, мл		Знайдений об'єм зразка порівняння евкالیптової олії, мл		Різниця, %
Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП	Прилад ДФУ	Прилад ФП	
0.52	0.52	0.2	0.2	0.66	0.70	0.14	0.18	22
0.52	0.53	0.2	0.2	0.67	0.71	0.15	0.18	17

4. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — С. 290-295.
5. 2.8.12. Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — Додовнення 1. — 2004. — С. 59-60.
6. Oznaczenie zawartosci olejku // Farmacopea Polska. — VI wyd. — Warszawa. — 2004. — С. 151.
7. Вопросы введения в ГФУ монографии «Валерианы корни» / Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Котов А.Г., Тихоненко Т.М., Лукьянова И.С. // Фармаком. — 2007. — № 1. — С. 37-45.

УДК 615.11

Резюме

Котова Э.Э., Котов А.Г., Морозов Р.В.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Сравнительный анализ фармакопейных методик определения содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье

Проведен сравнительный анализ методик определения содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье (ЛРС) ведущих фармакопей мира, а именно методик ГФ XI, Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) и Фармакопей Польши (ФП). Отмечены отличия в цене деления градуированной трубки и конструкционные особенности конденсирующих систем приборов (холодильников).

Установлено отличие во всех методиках в части использования растворителя для поглощения эфирного масла. Определено, что в методике ФП максимально учитываются все возможные потери ксилола при перегонке, данная методика отличается требованиями к подготовке прибора к испытанию.

В результате изучена зависимость количественного содержания эфирного масла от конструкции приборов ГФУ и ФП. Предложено в общую статью ГФУ 2.8.12. «Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження» разработать национальную часть, в которую включить описание прибора ФП.

Ключевые слова: Государственная Фармакопея Украины, фармакопейные методики, определение содержания эфирного масла, лекарственное растительное сырье.

UDC 615.11

Summary

Kotova E.E., Kotov A.G., Morozov R.V.

State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines», Kharkiv

Comparative analysis of pharmacopoeial methods for determination of essential oil in herbal drugs

A comparative analysis of pharmacopoeial methods for determining the content of essential oil in medicinal herbs, namely techniques of State Pharmacopoeia of USSR XIth ed. (SP USSR XI), State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) and Polish Pharmacopoeia (PP). Differences in the scale division value of the graduated tube and structural features of the cool-

ing systems are determined for the studied apparatuses are marked. Therefore, in the PP and the SP USSR XI (method 3) direct condenser is used, and in the SPU ball-type condenser is used that can make a difference by «settling» of essential oil to a larger surface area.

The differences were revealed in all methods regarding the procedures for the use of the solvent to absorb the essential oils. It was found that the method of PP takes into account all possible xylene losses during the distillation process. In addition, this technique has different requirements to preparing the apparatus for the test. Based on these facts, in the experimental part of this work a comparative analysis of the determination of the essential oil as described in the SPU was carried out, using the device described in the PP.

The following herbal drugs samples were selected as material to be tested: sage leaves, thyme herb, peppermint leaves, yarrow herb, chamomile flowers, oregano herb and eucalyptus leaves.

As a result, the dependence of the quantitative content of the essential oil from the design of the apparatuses described in SPU and PP was studied. Overestimation of the results of essential oils content determination with the use of the apparatus described in PP was found compared to the SPU apparatus which ranged from 20 % to 30 % (rel.). In some cases, this difference is essential as the sample does not meet the requirements when analyzed according to the SPU and the same sample meets the requirements when analyzed according to the PP (e.g., peppermint, chamomile flowers, 2 samples of sage). The reason is likely related to the design of the condenser as visually on the surface of the ball condenser more significant traces of essential oils were observed than on the surface of the direct condenser.

The samples of eucalyptus leaves were used to show that the uncertainty of the results of quantitative determination of the essential oil content in the case of using the PP apparatus is less than in the case of using the SPU apparatus and reproducibility of the results depended significantly on the method of apparatus cleaning after and before usage. The method described in the PP proved to be the most acceptable.

As a result of the performed study it is proposed to develop and implement a national part of the general chapter of SPU 2.8.12. «Determination of essential oils in herbal drugs», which will enable use of the method with the PP apparatus.

Keywords: State Pharmacopoeia of Ukraine, pharmacopoeial methods, determination of essential oils, herbal drugs.

Котова Еліна Едуардівна. Закінчила Харківський державний університет (1983). Пров. наук. співр. відділу ДФУ ДП «Фармакопейний центр». К.фарм.н. (2005).

Котов Андрій Георгійович. Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). Заст. нач. відділу ДФУ ДП «Фармакопейний центр». Д.фарм.н. (2014).

Морозов Роман Васильович. Закінчив ХНУ ім. В.Н. Каразіна (2012). Мол. наук. співр. відділу ДФУ ДП «Фармакопейний центр».

УДК 547.314

Микаилова Н.Х., Серкерев С.В.
Институт ботаники НАН Азербайджана

Диангелат келлактона – новый компонент корней *Seseli campestre* Bess.

Из смолы корней *Seseli campestre* Bess. выделен анулярно конденсированный диэфир дигидропиранокумарина с химической формулой $C_{24}H_{26}O_7$ и температурой плавления (176-177) °С.

В области характеристических частот ИК-спектра найдены полосы поглощения δ -лактонного цикла (1730 cm^{-1}), α,β -ненасыщенных сложэфирных групп (1718 cm^{-1}) и двойных связей (1647; 1615; 1598 cm^{-1}).

В ^{13}C ЯМР-спектре проявляются 24 синглетных сигнала (16.00; 16.05; 19.05; 20.05; 23.00; 26.00; 60.00; 70.00; 78.00; 97.00; 108.00; 113.00; 114.00; 127.00; 128.00; 130.00; 138.00; 140.00; 144.00; 153.00; 157.00; 160.00; 165.05; 165.10 м.д.). Из них, согласно ^{13}C Dept 135 ЯМР-спектру, 14 сигналов относятся к протонированным атомам углерода, в том числе 6 сигналов — к атому углерода в метильном радикале (16.00; 16.05; 19.05; 20.05; 23.00; 26.00 м.д.) и 6 сигналов — к протонированным атомам углерода при двойной связи ($-CH=$, 113.00; 114.00; 130.00; 138.00; 140.00; 144.00 м.д.). Обнаруживаемые в 1H ЯМР-спектре однопротонные сигналы (6.25 м.д., д., J = 9.65 Гц, Н-3; 7.97 м.д., д., J = 9.65 Гц, Н-4; 6.87 м.д., д., J = 8.27 Гц, Н-6 и 7.65 м.д., д., J = 8.27 Гц, Н-5) наряду с сигналами метильных групп (1.75 м.д., с., $CH_3-C=$; 1.80 м.д., с., $CH_3-C=$; 1.85 м.д., д., J = 7.00 Гц, $CH_3-CH=$ и 1.90 м.д., д., J = 7.00 Гц, $CH_3-CH=$) однозначно указывают на принадлежность исследуемого соединения к этерифицированным двумя молекулами ангеликовой кислоты производным келлактона (3',4'-дигидросеселина).

Ключевые слова: *Seseli campestre*, дигидропиранокумарин, келлактон, ЯМР-спектроскопия, химический сдвиг.

Виды рода жабрица (*Seseli* L.) по сравнению с другими представителями семейства *Apiaceae* (Сельдерейных) в химическом отношении изучены недостаточно.

Первые исследования по изучению биологически активных веществ представителей рода *Seseli* проводились в Индии и России [1, 2]. Наиболее интенсивное изучение видов рода жабрица проводится в последние несколько десятилетий [3]. Такое нарастание интереса к этим объектам в значительной степени связано с выявлением в их составе большого числа биологически активных веществ, а именно производных кумарина, таких как псорален, ксантотоксин, бергаптен, птериксин, архангелицин, эдультин, а также других дигидрофуру- и дигидропиранокумаринов, на основе которых возможно создание эффективных лекарственных препаратов.

В составе лекарственного сырья видов *Seseli*, кроме кумаринпроизводных, обнаружены другие биологически активные вещества, такие как хромоны, полиацетиленовые соединения, флавоноиды, терпеновые хиноны и др. [4-7].

Согласно литературным данным из изученного сырья 41 вида жабрицы выделено в индивидуальном состоянии и установлено строение более 110 производных кумарина [3].

Материалы и методы

Объектом исследований служили корни *Seseli campestre* Bess., собранные в фазе цветения и частичного плодоношения в районе горы Бешбармак (Сиязанский район) Азербайджанской Республики.

Сумму биологически активных веществ получили путем экстракции корней жабрицы

ацетоном. Выделение веществ в индивидуальном состоянии осуществляли методом хроматографии на колонке, заполненной нейтральной окисью алюминия (III-IV степени активности (ст. акт.)).

Полученные вещества идентифицировали при помощи метода тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV 254. Температуру плавления ($T_{пл}$) определяли на нагревательном столике «Бозциус». ИК-спектр снимали на спектрометре Varian 640 IS в вазелиновом масле.

Спектры 1H и ^{13}C ЯМР снимали на спектрометре Bruker 300 с резонансной частотой 300 МГц для 1H и 75 МГц для ядер изотопа ^{13}C . В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид ($DMCO-d_6$). Химические сдвиги определяли относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (ТМС) по δ -шкале.

Получение суммы экстрактивных веществ. 300 г измельченных сухих корней *Seseli campestre* Bess. трижды (каждый раз в течение 3-х дней) экстрагировали ацетоном и обрабатывали известным способом [8, 9]. Получили 20.2 г экстрактивных веществ. Выход конечного продукта составил 6.73 %.

Получение диангелаткеллактона. 10.0 г смолы растворяли в 50 мл хлороформа и хроматографировали на колонке с окисью алюминия (нейтральная, III-IV ст. акт., $h = 45$, $d = 3$ см). Объем каждой фракции — 100 мл. Элюировали гексаном, смесью гексана и бензола в соотношениях 4:1, 3:2, 1:1, 1:2, бензолом, смесью бензола с хлороформом (4:1, 3:2, 1:1, 1:2) и хлороформом.

Из фракций 17-18, элюируемых смесью гексана и бензола в соотношении 1:1, выделили

кристаллическое вещество с химической формулой $C_{24}H_{26}O_7$ и $T_{пл} = (176-177)^\circ C$ (из водного этанола).

Результаты исследований и их обсуждение

Для вещества, полученного из фракций 17-18, с формулой $C_{24}H_{26}O_7$ и $T_{пл} = (176-177)^\circ C$ в области характеристических частот ИК-спектра найдены полосы поглощения δ -лактонного цикла (1730 см^{-1}), α, β -ненасыщенных сложноэфирных групп (1718 см^{-1}) и двойных связей (1647 см^{-1} , 1615 см^{-1} , 1598 см^{-1} и перегиб при 1490 см^{-1}).

В ^{13}C ЯМР-спектре соединения, снятом с полным подавлением спин-спиновой взаимодействия, проявляются 24 синглетных сигнала ($16.00; 16.05; 19.05; 20.05; 23.00; 26.00; 60.00; 70.00; 78.00; 97.00; 108.00; 113.00; 114.00; 127.00; 128.00; 130.00; 138.00; 140.00; 144.00; 153.00; 157.00; 160.00; 165.05; 165.10$ миллионов долей (м.д.)). Из них, согласно ^{13}C Dept 135 ЯМР-спектру, 14 сигналов относятся к протонированным атомам углерода, в том числе 6 сигналов — к атому углерода в метильном радикале ($16.00; 16.05; 19.05; 20.05; 23.00; 26.00$ м.д.) и 6 сигналов — к протонированным атомам углерода при двойной связи ($-CH=$, $113.00; 114.00; 130.00; 138.00; 140.00; 144.00$ м.д.). Сигналы при 60.00 м.д. и 70.00 м.д. в спектрах ^{13}C и Dept 135 относятся к атомам C-3' и C-4', к которым присоединены сложноэфирные группы. Следовательно, остальные десять сигналов, которые не проявляются в ^{13}C Dept 135 ЯМР-спектре, а обнаруживаются в ^{13}C спектре ($78.00; 97.00; 108.00; 127.00; 128.00; 153.00; 157.00; 160.00; 165.05; 165.10$ м.д.), принадлежат непротонированным атомам углерода.

В 1H ЯМР-спектре найдены сигналы, характерные для диэфиров дигидропиранокумаринов. Однопротонные дублетные сигналы, обнаруживаемые в слабом поле спектра 6.25 м.д. ($\Delta, J = 9.65$ Гц, H-3), 7.97 м.д. ($\Delta, J = 9.65$ Гц, H-4), 6.87 м.д. ($\Delta, J = 8.27$ Гц, H-6) и 7.65 м.д. ($\Delta, J = 8.27$ Гц, H-5), однозначно указывают на принадлежность исследуемого соединения к этерифицированным производным келлактона (3',4'-дигидросеселина) [1-3].

Шестипротонный синглет, резонируемый в ЯМР-спектре при 1.40 м.д. (с., 6H, $2CH_3$), относится к гемдиметильным группам молекулы келлактона.

Сигналы при 1.75 м.д. (с., 3H, $CH_3-C=$) и 1.80 м.д. (с., 3H, $CH_3-C=$) отнесены к метильным группам сложноэфирных групп. Шестипротонный, неразрешенный триплет, по-видимому вызванный частичным наложением компонентов двух дублетов метильных групп ($\Delta, 1.85, J = 7.00$ Гц, 3H, $CH_3-C=$ и $\Delta, 1.90$ м.д., $J = 7.00$ Гц,

3H, $CH_3-C=$), свидетельствует о присутствии в молекуле исследуемого соединения двух сложноэфирных групп, состоящих из остатков двух молекул ангеликовой кислоты [4].

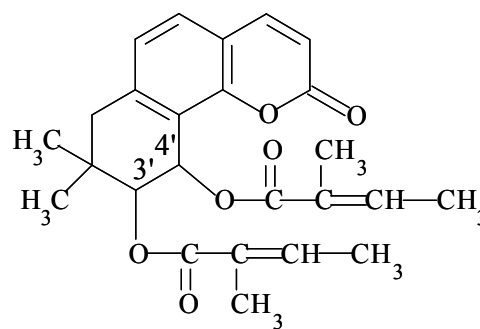
Можно было бы допустить, что одна из сложноэфирных групп является остатком сенеционовой кислоты. Однако в 1H ЯМР-спектре отсутствует сигнал олефинового протона ($-CH=$) остатка сенеционовой кислоты, обычно проявляемый в области $5.20-5.65$ м.д. спектра, например, в спектре самидина (5.59 м.д.), декурсина (5.57 м.д.), либанорина (5.55 м.д.), анделина (5.59 м.д.) и др. [4].

Обнаруживаемый в спектре двухпротонный квартет при 6.10 м.д. (к., $J_1 = 14.00$ Гц, $J_2 = 6.00$ Гц) характерен для винильных протонов двух ангелицильных групп.

Дублетные сигналы при 5.40 м.д. ($\Delta, J = 5.06$ Гц, 1H) и 6.55 м.д. ($\Delta, J = 5.06$ Гц, 1H) принадлежат вицинально взаимодействующим гемсложноэфирным протонам 3' и 4' соответственно.

Таким образом, на основании данных, полученных при расшифровке $^1H, ^{13}C, ^{13}C$ Dept 135 ЯМР-спектров, установлено, что исследуемое соединение имеет строение, идентичное аномалину [3, 11], и может быть описано как 3',4'-диангелоилокси-3',4'-дигидросеселин (диангелаткеллактон) (Рисунок).

Рисунок



(I)

Вывод

Из корней *Seseli campestre* Bess. выделен новый компонент — дигидропиранокумарин (3',4'-диангелоилокси-3',4'-дигидросеселин (аномалин)) с химической формулой $C_{24}H_{26}O_7$ и $T_{пл} = (176-177)^\circ C$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spath E., Bose P.K., Matzke S. et al. Die cumarine von *Seseli indicum* und die constitution des *Seselins* // Ber. — 1939. — Vol. 72. — P. 821-830.
2. Чернобай В.Т., Колесников Д.Г. Кумарины Жабрицы равнинной (*Seseli campestre*) // Укр. Ж. — 1959. — Т. 25, № 1. — С. 111-113.

3. Абышев А.З., Агаев Э.М., Керимов Ю.Б. Химия и фармакология природных кумаринов. — Баку, 2003. — 112 с.
4. Larsen P.K., Nielsen B.E., Lemmich J. Constituents of *Umbelliferous* plants. XII. Absolute configuration of falkarinol an acetylenic compound from the roots of *Seseli gummiferum* Pall. // *Acta Chem. Scand.* — 1969. — Vol. 23, № 7. — P. 2552-2554.
5. Bohlmann F., Zdero C., Suwita A. Natürlich Vorkommende Terpendervate. LI. Ein neues 8 sesquiterpenchmon aus *Seseli-Arten* // *Chem. Ber.* — 1975. — Bd. 108, № 8. — P. 2818-2821.
6. Bohlmann F., Zdero C. Über die inhaltsstoff der gattung *Seseli* // *Chem. Ber.* — 1971. — Bd. 104, № 8. — P. 2354-2358.
7. Bohlmann F., Zdero C. Netis Über ein Weiteres isoeugenol-derivat aus Umbelliferen // *Chem. Ber.* — 1971. — Bd. 104, № 6. — P. 2033-2034.
8. Курбанова Ф.К., Серкерев С.В. Этерифицированные дигидрофурукумарины корней *Seseli transcaucasicum* (*Apiaceae*) // Растительные ресурсы. — 2012. — Т. 48, Вып. 2. — С. 228-233.
9. Касумова Г.К., Серкерев С.В. Новый этерифицированный фурукумарин из корней *Heracleum pastinacifolium* // Химия природ, соедин. — 2012. — №6. — С. 848-850.
10. Шагова Л.И., Флоря В.Н., Кузнецова Г.А., Перельсон М.Е. Диэфиры келлактона и рутарин (кампесенин) из *Seseli campestre*, произрастающей в Молдавии // Химия природ, соедин. — 1973. — № 5. — С. 665-666.
11. Перельсон М.Е., Шейнкер Ю.Н., Савина А.А. Спектры и строение кумаринов, хромонов и ксантонов. — М.: Медицина, 1975. — 232 с.

УДК 547.314

Микаилова Н.Х., Серкерев С.В.

Институт ботаники НАН Азербайджану

Диангелат келлактону — новый компонент корня *Seseli campestre* Bess.

Из смолы корня *Seseli campestre* Bess. выделенный ангуглярно конденсований диэфир дигидропиранокумарину з химичною формулою $C_{24}H_{26}O_7$ і температурою плавлення (176-177) °С.

В області характеристичних частот ІЧ-спектра знайдені смуги поглинання δ-лактонного циклу (1730 см^{-1}) α,β-ненасичених складноэфірних груп (1718 см^{-1}) і подвійних зв'язків (1647 ; 1615 ; 1598 см^{-1}).

У ^{13}C ЯМР-спектрі виявляються 24 синглетних сигнали (16.00 ; 16.05 ; 19.05 ; 20.05 ; 23.00 ; 26.00 ; 60.00 ; 70.00 ; 78.00 ; 97.00 ; 108.00 ; 113.00 ; 114.00 ; 127.00 ; 128.00 ; 130.00 ; 138.00 ; 140.00 ; 144.00 ; 153.00 ; 157.00 ; 160.00 ; 165.05 ; 165.10 м.ч.). З них, згідно з ^{13}C Dept 135 ЯМР-спектром, 14 сигналів належать протонуваним атомам вуглецю, зокрема 6 сигналів — атому вуглецю в метильному радикалі (16.00 ; 16.05 ; 19.05 ; 20.05 ; 23.00 ; 26.00 м.ч.) і 6 сигналів — протонуваним атомам вуглецю при подвійному зв'язку ($-\text{CH}=\text{}$, 113.00 ;

114.00 ; 130.00 ; 138.00 ; 140.00 ; 144.00 м.ч.). Однопротонні сигнали (6.25 м.ч. , д., $J = 9.65$, H-3; 7.97 м.ч. , д., $J = 9.65$ Гц, H-4; 6.87 м.ч. , д., $J = 8.27$ Гц, H-6 і 7.65 м.ч. , д., $J = 8.27$ Гц, H-5), що виявляються у ^1H ЯМР-спектрі, разом із сигналами метильних груп (1.75 м.ч. , с., $\text{CH}_3-\text{C}=\text{}$; 1.80 м.ч. , с., $\text{CH}_3-\text{C}=\text{}$; 1.85 м.ч. , д., $J = 7.00$ Гц, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{}$ і 1.90 м.ч. , д., $J = 7.00$ Гц, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{}$) однозначно вказують на приналежність досліджуваної сполуки до етерифікованих двома молекулами ангелікової кислоти похідних келлактону (3,4-дигідросеселіну).

Ключові слова: *Seseli campestre*, дигідропіранокумарин, келлактон, ЯМР-спектроскопія, хімічний зсув.

UDC 547.314

Summary

Mikailova N.Kh., Serkerov S.V.

Institute of Botany of Azerbaijan NAS

Diangelat kellacton — a new component from the roots of the *Seseli campestre* Bess.

Diester of angular condensed dihydropyranocoumarin with elemental composition of $C_{24}H_{26}O_7$, m.p. (176-177) °C was isolated from resin of roots of the *Seseli campestre* Bess. In the region of characteristic frequencies of IR-spectrum are found bands of δ-lactone ring (1730 cm^{-1}), α,β-unsaturated ester group (1718 cm^{-1}) and double bonds (1647 ; 1615 ; 1598 cm^{-1}).

In ^{13}C NMR-spectrum 24 singlet signals appear (16.00 ; 16.05 ; 19.05 ; 20.05 ; 23.00 ; 26.00 ; 60.00 ; 70.00 ; 78.00 ; 97.00 ; 108.00 ; 113.00 ; 114.00 ; 127.00 ; 128.00 ; 130.00 ; 138.00 ; 140.00 ; 144.00 ; 153.00 ; 157.00 ; 160.00 ; 165.05 ; 165.10 ppm). According to the ^{13}C Dept 135 NMR-spectrum 14 signals are protonated carbon atoms, including 6 methyl (16.00 ; 16.05 ; 19.05 ; 20.05 ; 23.00 ; 26.00 ppm) and 6 protonated carbon atoms at the double bond ($-\text{CH}=\text{}$, 113.00 ; 114.00 ; 130.00 ; 138.00 ; 140.00 ; 144.00 ppm). The one-proton signals (6.25 ppm , d., $J = 9.65$, H-3; 7.97 ppm , d., $J = 9.65$, H-4; 6.87 ppm , d., $J = 8.27$, H-6 and 7.65 ppm , d., $J = 8.27\text{ Hz}$, H-5) detected by ^1H NMR-spectrum together with the signals of the methyl group (1.75 ppm , s., $\text{CH}_3-\text{C}=\text{}$; 1.80 ppm ; s., $\text{CH}_3-\text{C}=\text{}$, 1.85 ppm , d., $J = 7.00$, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{}$ and 1.90 ppm , d., $J = 7.00\text{ Hz}$, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{}$) univocally indicate belonging of the studied compound to esterified (with two molecules of angelic acid) derivative of kellactone (3',4'-dihydroseselin).

Keywords: *Seseli campestre*, dihydropyranocoumarin, kellacton, NMR-spectroscopy, chemical shift.

Микаилова Нигяр Хизри кызы. Диссертант Института ботаники НАН Азербайджана.

Серкерев Сираждедин Вели оглу. Заслуженный деятель Азербайджанской Республики, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Института ботаники НАН Азербайджана.

Рибалкін М.В.
Національний фармацевтичний університет

Обґрунтування оптимального методу інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*

Досліджені фізичний, хімічний та фізико-хімічний методи інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *C. tropicalis*. Для визначення оптимального методу інактивації клітин грибів у кожному випадку проведено висівання оброблених клітин грибів на живильне середовище Сабуро. Згідно одержаних результатів визначено, що фізико-хімічний метод забезпечує повну інактивацію клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Ключові слова: кандидамікоз, інактивовані клітини, антиген, імунітет, вакцина.

За останні роки серед людей та тварин різко зросла кількість хворих на кандидоз, який викликається дріжджеподібними грибами роду *Candida* [2, 3, 15, 18]. Зростання захворюваності на кандидоз пов'язане з нераціональним використанням антибіотиків, гормонів, стероїдних препаратів, імунодепресантів та інших препаратів, а також посиленням патогенності самих дріжджеподібних грибів роду *Candida* [3, 18]. Кандидоз проявляється у різних формах, з яких найбільшу небезпеку представляють системний та вісцеральний кандидоз. Ці форми захворювання характеризуються тривалим протіканням хвороби, мають різноманітні клінічні прояви та часті рецидиви [2, 15]. Такі форми кандидозу важко піддаються лікуванню сучасними медикаментозними засобами, в тому числі й протигрибковими антибіотиками [6, 9, 17]. У зв'язку з цим для терапії кандидозних захворювань є перспективним використання специфічної стимуляції захисних механізмів організму [1, 4, 5, 7, 10, 13]. Для вирішення цієї проблеми стає актуальною розробка вакцини на основі грибів роду *Candida*. Подібні дослідження активно проводяться за кордоном [8, 11, 12, 14, 16].

Розглянемо вакцини, одержані шляхом інактивації клітин грибів роду *Candida*. Інактивовані вакцини займають важливе місце у профілактиці різних інфекцій [1, 4, 7]. Для їх виготовлення використовують необхідні мікроорганізми-збудники. Мікроорганізм піддається такій обробці, яка призводить до необхідної втрати здатності до відтворення (реплікації, розмноження), але при цьому зберігаються антигенні та імуногенні властивості [1, 4, 5, 10, 13]. На практиці саме в цьому і полягає проблема виготовлення інактивованих вакцин: при інактивації збудника втрачається більша або менша частина його імуногенної активності (що обумовлено пошкодженням антигенних структур) та одночасно можливість розмноження та реплікації антигена в макроорганізмі. Тому прикладні дослідження з розробки інактивованих

вакцин спрямовані передусім на постійний пошук «ідеального» способу інактивації.

Для інактивації клітин дослідники використовують хімічні та фізичні методи. В якості хімічних інактиваторів на практиці широко використовують дезінфектанти, які пройшли перевірку на свою доцільність у виробництві вакцин. Так, широко відомі такі речовини-інактиватори та консерванти, як фенол, формалін, ацетон, хлороформ, толуол, мертіолат [1, 5, 10, 13].

Особливе місце серед інактивуючих речовин займає формалін. Він і досі є найбільш використовуваним засобом для знешкодження токсинів і все ще знаходить широке використання при виготовленні інактивованих вакцин. Формалін особливо придатний для виробництва вакцин з цільної культури бактерій, так як він одночасно інактивує бактерії і токсичні продукти їх обміну в анатоксини [4, 7, 10]. Цікаво, що формалін відносно добре та тривало зберігає антигенну структуру збудника. Використання м'яких температур ($(25 \pm 2)^\circ\text{C}$) допомагає прискорити процес інактивації, не викликаючи при цьому зниження імуногенності вакцини [7, 10, 12].

Препарати для хімічної інактивації необхідно дуже продумано добирати та ретельно перевіряти для кожного конкретного випадку. Багато сполук утворюють з білками вакцини комплекси з повністю зміненими антигенними властивостями, які здатні викликати сенсibiliзацію макроорганізму [4, 7, 10]. Також необхідно враховувати, що чим менше додається хімічних сполук, тим краще зберігаються імуногенні властивості збудника, але і тим більше вірогідність того, що вірулентні структури мікроорганізму переживуть процес інактивації [7, 12]. Необхідна велика попередня робота, щоб у залежності від конкретного збудника, складу культуральної рідини та конкретного інактиватора вдалося знайти найкращу методику цього процесу в тому, що стосується співвідношення компонентів, тривалості та температурного режиму.

Також широко використовуються фізичні методи інактивації мікроорганізмів. Використання тепла для інактивації збудника у виробництві вакцин не завжди забезпечує повну інактивацію [1, 4, 7, 10]. Деякі дослідники вважають, що імунізуючі властивості бактеріальних та вірусних суспензій помітно слабшають або повністю руйнуються при прогріванні протягом однієї години вже при температурі $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$ [7, 10, 12].

Відомий метод для інактивації збудників — лагідна тендалізація. Цей метод полягає в тому, що суспензію зі збудником прогривають упродовж 16 год, потім залишають при кімнатній температурі впродовж 7 год. За той час, поки суспензія залишається при кімнатній температурі, мікроорганізми, що вижили у товщі шару суспензії, потрапляють у зовнішній шар. Ці мікроорганізми інактивуються при наступному етапі прогривання. Таке чергування температур проводять 3 рази [7, 8, 10]. На думку багатьох дослідників, використання ультразвуку, ультрафіолетового світла та іонізуючого випромінювання не забезпечує необхідних результатів [1, 4, 7, 10].

Тобто, щоб розробити інактивовану вакцину для профілактики та лікування кандидозної інфекції, перш за все необхідно обґрунтувати технологічний режим інактивації клітин грибів роду *Candida*, який би забезпечував повну інактивацію збудників та зберігав їх антигенні та імуногенні властивості. Тому доцільно розділити дані дослідження на два етапи: на першому етапі слід обґрунтувати лагідні методи повної інактивації збудника, а на другому — дослідити імуногенні властивості інактивованих збудників — грибів роду *Candida*.

Для розробки кандидозної вакцини необхідно визначити штами або види мікроорганізмів, які є найбільш розповсюдженими або є головними збудниками кандидозної інфекції. Згідно з даними літератури, при видовій ідентифікації виділених штамів від хворих на кандидозну інфекцію встановлено, що практично в усіх випадках захворювання збудниками хвороби є гриби виду *C. albicans*. Другим за частотою виділення є вид *C. tropicalis*, який зустрічається, як правило, в асоціації з *C. albicans*. В окремих випадках виявлені *C. parapsilosis*, *C. glabrata* і *C. Krusei*, також в асоціації з *C. albicans* або *C. albicans* та *C. tropicalis*. Таким чином, перспективно проводити дослідження з грибами *C. albicans* та *C. tropicalis* [2, 3, 8, 15, 18].

Метою даної роботи було експериментальне обґрунтування методу лагідної інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Матеріали та методи

Усі дослідження проводили у ламінарному боксі в асептичних умовах. Для проведення інактивації клітин грибів *C. albicans* ССМ 335-867 та *C. tropicalis* АТТС 20336 їх попередньо окремо культивували за схемою у пробірках на агарі Сауро при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 48 год та змивали клітини грибів за допомогою 10 мл стерильного ізотонічного 0.9 % розчину натрію хлориду. Переносили окремо одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на матраци з агаром Сауро, які інкубували при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 6 діб, та змивали клітини грибів за допомогою 25 мл стерильного ізотонічного 0.9 % розчину натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* візуально та методом мікроскопії. Далі проводили центрифугування при 3000 об/хв протягом 10 хв. Одержаний осад клітин грибів доводили стерильним ізотонічним 0.9 % розчином натрію хлориду до концентрації 8×10^8 - 8×10^9 клітин у 1 мл та стандартизували суспензії шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва.

Для інактивації клітин застосовували фізичний, хімічний та фізико-хімічний методи. Фізичний метод полягає в наступному. Суспензії з концентрацією 8×10^8 - 8×10^9 клітин у 1 мл, приготовлені як описано вище, окремо інактивували шляхом нагрівання до температури $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 1 год у об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів у всіх шарах суспензії. Температуру підтримували шляхом розташування ємностей з досліджуваними суспензіями грибів на водяній бані. Запропонований метод інактивації клітин займає значно менше часу та забезпечує більш рівномірну інактивацію клітин за рахунок постійного перемішування порівняно з описаною вище лагідною тендалізацією, яка триває 63 год і є статичним процесом, при якому шари суспензії з клітинами самостійно дуже повільно перемішуються під час нагрівання.

Хімічний метод полягає в наступному. Суспензії з концентрацією 8×10^8 - 8×10^9 клітин у 1 мл, приготовлені як описано вище, окремо інактивували за допомогою формаліну. До вказаних суспензій у об'ємі 100 мл окремо додавали формалін у концентрації 40 %, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензіях до 0.5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв протягом 5 хв та залишали протягом доби при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. Класичний метод інактивації мікроорганізмів за допомогою формаліну

триває, за різними джерелами, від 14 до 20 діб при кімнатній температурі. Така тривала інактивація є нераціональною, тому для пришвидшення процесу було використане нагрівання до температури (25 ± 2) °С. Використання більш високої температури в поєднанні з хімічним агентом може ослабити імуногенні та антигенні властивості інактивованих клітин. Температуру підтримували шляхом розташування ємностей з досліджуваними суспензіями грибів на водяній бані. Нагрівання до температури (25 ± 2) °С виключає зниження імуногенних властивостей клітин грибів у подальшому.

Фізико-хімічний метод полягає в наступному. Комплексну інактивацію суспензії клітин грибів проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну. Суспензії з концентрацією 8×10^8 - 8×10^9 клітин у 1 мл, приготовлені як описано вище, окремо інактивували шляхом нагрівання до температури (50 ± 2) °С протягом 1 год у об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів у всіх шарах суспензії. Після чого до кожної суспензії грибів додавали формалін у концентрації 40 %, доводячи його кінцеву концентрацію в суспензіях до 0.5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв протягом 5 хв та залишали протягом доби при температурі (25 ± 2) °С. Температуру підтримували шляхом розташування ємностей із досліджуваними суспензіями на водяній бані. Як зазначено вище, нагрівання до температури (25 ± 2) °С виключає зниження імуногенних властивостей клітин грибів у подальшому.

У кожному випадку відбирали контрольну пробу суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* і окремо висівали їх на живильне середовище агар Сабуро. Змішували 1 мл суспензії клітин грибів з 20 мл розплавленого агару, охолодженого до температури (40 ± 2) °С та інкубували при температурі (25 ± 2) °С протягом 48 год [5].

Результати та їх обговорення

Згідно з одержаними даними фізичний метод не забезпечує повної інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. На живильних середовищах Сабуро після культивування інактивованих клітин грибів зазначеним методом було виявлено ріст колоній грибів: *C. albicans* – 12-17 колонієутворюючих одиниць (КУО) та *C. tropicalis* – 10-15 КУО. Ймовірно, що температура (50 ± 2) °С є недостатньою для зупинення життєдіяльності клітин грибів, а використання більш високої температури може привести до ослаблення або втрати імуногенних властивос-

тей клітин. Тому даний фізичний метод був відхилений. Було встановлено, що хімічний метод також не забезпечує повної інактивації клітин грибів. На живильних середовищах Сабуро після культивування інактивованих клітин грибів зазначеним методом було виявлено ріст колоній грибів: *C. albicans* – 9-14 КУО та *C. tropicalis* – 7-12 КУО. Отже, для інактивації клітин грибів хімічним методом необхідно збільшити концентрацію формаліну, але це може ослабити імуногенні властивості клітин. Хімічний метод також було відхилено. Визначено, що комплексне використання фізичного та хімічного факторів забезпечує повну інактивацію клітин грибів. На живильних середовищах Сабуро після культивування інактивованих клітин грибів зазначеним методом не було виявлено зростання колоній. Таким чином, було обрано саме цей метод для інактивації клітин *C. albicans* та *C. tropicalis*. Результати досліджень наведені в Табл. 1.

Таблиця 1

Методи інактивації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*

Метод інактивації	Загальне число грибів, КУО	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
Фізичний метод	12-17	10-15
Хімічний метод	9-14	7-12
Фізико-хімічний	0	0

Примітка: n = 6.

Одержані інактивовані клітини *C. albicans* та *C. tropicalis* у подальшому мають пройти випробування на токсичність, тобто безпечність при введенні їх дослідним тваринам, та на імуногенність, тобто на здатність формувати імунітет у дослідних тварин. Тільки при одержанні позитивних результатів у подальших запланованих дослідженнях можна буде вважати, що даний метод інактивації клітин грибів роду *Candida* є перспективним для розробки інактивованої вакцини для профілактики та лікування кандидозної інфекції.

Висновки

Комплексне використання фізичних та хімічних факторів, тобто окреме нагрівання суспензії з концентрацією 8×10^8 - 8×10^9 /мл клітин грибів *C. albicans* ССМ 335-867 та 8×10^8 - 8×10^9 /мл клітин грибів *C. tropicalis* АТТС 20336 до температури (50 ± 2) °С протягом 1 год у об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв з подальшим додаванням до суспензій формаліну в концентрації 40 %, доведення його кінцевої концентрації у суспензіях до 0.5 %, перемішування електромішалкою зі швидкістю 100 об/хв протягом 5 хв та витримання суспензій протягом доби при

температурі (25 ± 2) °C, забезпечує повну інактивацію клітин грибів.

Слід зазначити, що одержані результати в подальшому будуть використані при створенні інактивованої вакцини на основі біомаси грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, необхідної для профілактики та лікування кандидозної інфекції, оскільки це є нагальним питанням для сучасної медицини, ветеринарії та фармації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жукова Н.В. Современные вакцины: характеристика и классификация / Н.В. Жукова, И.М. Кривошеева // Крымский терапевтический журнал. — 2013. — № 2. — С. 99-104.
2. Ильина И.В. Глубокий кандидоз — актуальность и перспективные проблемы / И.В. Ильина, С.А. Масюкова, М.В. Устинов // Русский медицинский журнал. — 2004. — № 4. — С. 189.
3. Капустина О.А. Видовой состав и биологические свойства грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека / О.А. Капустина, Л.Е. Логачева, О.Л. Карташова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2009. — Т. 4, № 24. — С. 179-181.
4. Ляшенко В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев — М.: Медицина, 1982. — 271 с.
5. Молчанов Г.И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические и биотехнологии в фармации: учеб. пособие / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Ю.А. Морозов. — М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2009. — 336 с.
6. Панфилова Л. Аналитический обзор рынка противогрибковых средств в ретроспективе / Л. Панфилова // Провизор. — 2002. — № 7. — С. 24-26.
7. Петров Р.В. Иммуногены и вакцины нового / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов — М.: ГЭОСТАР-Медицина, 2011. — 608 с.
8. Шарафутдинов А.М. Технология получения протективного антигена гриба *Candida albicans* и возможность его практического применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / А.М. Шарафутдинов; Ульян. гос. с.-х. акад. Ульяновск, 2001. — 23 с.
9. Antifungal agents: mode of action in yeast cells / A.J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P.A. Ezkurra, and G. Quindós // Revista Espanola de Quimioterapia. — 2006. — Vol. 19, № 2. — P. 130-139.
10. Bauer K. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie / K. Bauer. — 7. Aufl. — Stuttgart: Wiss. Verl. — Ges., 2002. — 496 s.
11. *Candida albicans* vaccines / Aditi Grover, B.S. Bhandari, Nishant Rai, Pramesh C Lakhera // Biotechnology International. — 2010. — Vol. 3, № 1. — P. 4-17.
12. Cassone. A. Fungal vaccines: real progress from real challenges / A. Cassone // Lancet Infect dis. — 2008. — Vol. 8. — P. 114-124.
13. Daan J.A. Crommelin pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications, third edition / Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. — Third, 2007. — 496 p.
14. Immune responses induced by heat-killed *Saccharomyces cerevisiae*: a vaccine against fungal infection / M. Liu et al. // Vaccine. — 2011. — V. 29. — P. 1745-1753.
15. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program / M.A. Pfaller, R.N. Jones, S.A. Messer, M.B. Edmond and R.P. Wenzel // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. — 1998. — Vol. 31, № 1. — P. 327-332.
16. Partial protection against experimental vaginal candidiasis after mucosal vaccination with heat-killed *Candida albicans* and the mucosal adjuvant LT(R192G) / L. C rdenas-Freytag, C.

- Steele, F.L. Wormley Jr, E. Cheng, J.D. Clements // Fidel. — 2002. — Vol. 40, № 3. — P. 291-299.
17. Sheehan D.J. Current and emerging azole antifungal agents / D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock and C.M. Sibley // Clinical Microbiology Reviews. — 1999. — Vol. 12, № 1. — P. 40-79.
18. The direct cost and incidence of systemic fungal infections / L.S. Wilson, C.M. Reyes, M. Stolpman, J. Speckman, K. Allen and J. Beney // Value in Health. — 2002. — Vol. 5, № 1. — P. 26-34.

УДК 616.992.282:615.012.6:615.371

Резюме

Рыбалкин Н.В.

Национальный фармацевтический университет

Обоснование оптимального метода инактивации клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis*

Исследованы физические, химические и физико-химические методы инактивации клеток грибов *Candida albicans* и *C. tropicalis*. Для обоснования оптимального метода инактивации клеток грибов в каждом случае проведен посев обработанных клеток грибов на питательную среду Сабуро. Согласно полученным результатам установлено, что физико-химический метод обеспечивает полную инактивацию клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis*.

Ключевые слова: кандидамикоз, инактивированные клетки, антиген, иммунитет, вакцина.

UDC 616.992.282:615.012.6:615.371

Summary

Rybalkin M.V.

National University of Pharmacy, Kharkov

Rationale for optimal method of fungal cells *Candida albicans* and *Candida tropicalis* inactivation

Number of patients with candidiasis in humans and animals has increased dramatically in recent years. Candidiasis is caused by yeast fungi *Candida*. The increase in the incidence of candidiasis is associated with irrational use of antibiotics, hormones, steroids, immunosuppressants and other drugs. Candidiasis is manifested in different forms. The greatest danger is posed by systemic and visceral candidiasis. These forms of candidiasis are difficult to treat with modern medications. There is an urgent need to develop a vaccine based on the fungi of the genus *Candida* for the prevention and treatment of *Candida* infections. In this article physical, chemical and physico-chemical methods of inactivation of the fungal cell *C. albicans* and *C. tropicalis* were studied. To justify the optimal method of fungal cells inactivation in each case inoculation of treated cells of fungi on Sabouraud medium was carried out. The study used a suspension with a concentration of 8×10^8 – 8×10^9 cells per 1 ml for *C. albicans* strain CCM 335-867 and 8×10^8 – 8×10^9 cells per 1 ml for *C. tropicalis* strain ATTC 20336. Physical method consists of the procedure as follows: fungi cells were treated separately at the temperature of (50 ± 2) °C for 1 hour in a volume of 100 ml with constant stirring with a stirrer speed of 100 rev/min. Chemical method consists of the procedure as follows: formalin was added to the suspensions at a concentration of 40 %. The final concentration of formaldehyde in the suspensions was 0.5 %. The suspensions were stirred with electric stirrer with the speed of 100 rev/min for 5 min and the suspension was kept overnight at (25 ± 2) °C. Physico-chemical method lays in combining the methods described above. According to the obtained results, it was found that the physico-chemical method provides complete inactivation of *C. albicans* and *C. tropicalis* cells.

Keywords: candidiasis, inactivated cells, antigen, immunity, vaccine.

Рибалкін Микола Вікторович. К.фарм.н., асистент кафедри біотехнології Національного фармацевтичного університету.

Хортецька Т.В., Мазулін О.В., Буряк В.П., Єренко О.К., Мазулін Г.В.
Запорізький державний медичний університет

Накопичення аукубіну в листі видів роду *Plantago* L. флори України

Метою роботи було кількісне визначення аукубіну в листі досліджуваних видів роду *Plantago* L. і дослідження накопичення цієї сполуки під час цвітіння рослин в умовах України. Об'єктом дослідження була рослинна сировина (листя) *P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L. та *P. altissima* L., яку заготовлено в різних регіонах України (2010-2013 рр.) у період цвітіння. Ідентифікацію та визначення кількісного вмісту компонентів проводили за допомогою хромато-мас-спектрометрії. Встановлено присутність та кількісний вміст аукубіну в листі досліджуваних видів роду *Plantago* флори України. Методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням вперше встановлено, що найвищі концентрації речовини характерні для листя *P. altissima* L. – до $(2.57 \pm 0.13) \%$. Листя *P. media* L., *P. altissima* L., *P. major* L. перспективні для отримання протизапальних лікарських засобів.

Ключові слова: подорожник, аукубін, іридоїд, газова хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням, гепатопротективна дія, антиоксидантна дія.

Родина подорожникові (*Plantaginaceae* Juss.) налічує 4 роди та до 265 видів відносно невисоких трав'янистих рослин. Вони досить звичні в природних біоценозах, але також постійно зустрічаються в рослинних угрупованнях, порушених під впливом діяльності людини. Рід подорожник (*Plantago* L.) – найбільший за чисельністю видів (210), які поширені переважно в помірних областях обох півкуль і лише іноді – у тропіках. На території Росії та СНД зростають до 43 видів роду *Plantago* [9]. В сучасній флорі України налічують 15 найбільш розповсюджених видів [6]. Рослини досить звичні в регіонах з різними природними умовами: від болотистих місцевостей до пустель, гірських плато та морських берегів. Проростають на піщаних ґрунтах, по луках, степах, узліссях, пустирищах, пасовищах, а також навколо ставків, річок, уздовж доріг. Багато видів роду культивуються в країнах Європи, Азії, Північної Америки, Росії, України [5, 13].

На наш час в Україні офіційними видами роду є *P. major* L. (сировина – листя) і *P. psyllium* L. (син. *P. scabra* Moench., сировина – насіння). У країнах Європейського Союзу як фармакопейні використовують *P. lanceolata* L., *P. afra* L., *P. indica* L., *P. ovata* L. (монографії Європейської Фармакопеї (ЄФ)). У Російській Федерації листя *P. media* L. є офіційною лікарською рослинною сировиною (ЛРС) поряд з *P. major*, *P. lanceolata* та насінням *P. psyllium*. У деяких країнах світу офіційною ЛРС є коріння *P. major*, *P. lanceolata* та *P. media* [2, 3, 5, 7].

Рослинна сировина видів роду *Plantago* відома в багатьох країнах світу як важливе джерело біологічно активних речовин: іридоїдів, вітаміну К₁, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, полісахаридів, амінокислот, органічних кислот, які накопичуються переважно в надземній частині рослин [5, 7, 10, 11, 12, 13, 15].

У сучасній медицині застосовують численні препарати, до складу яких входять екстракти або сік з видів роду *Plantago*: «Гербіон сироп або сік з видів роду *Plantago*: «Гербіон сироп подорожника» (Словенія), «Сироп від кашлю Др. Тайсса» (Німеччина), «Сік подорожника» (Росія), «Дефенорм» (Україна), «Пекторал» (Швейцарія), «Тусавіт» (Австрія), «Агіолакс» (Німеччина), «Евкабал сироп» (Німеччина) та ін. [4, 5, 7, 8].

Для стандартизації рослинної сировини *P. major* в Україні до Державної Фармакопеї України (ДФУ) першого видання (Доповнення 3) введено монографію «Подорожника великого листя», яка вимагає проводити визначення вмісту полісахаридів (не менше 12%), суми похідних орто-дигідрокоричної кислоти (не менше 1.5% у перерахунку на актеозид), макро- та мікроскопічні дослідження. Проте ця монографія не передбачає встановлення кількісного вмісту іридоїдів, що не дає можливості провести повноцінну стандартизацію досліджуваної рослинної сировини [3, 5, 7].

Велика увага до дослідження іридоїдів у останні роки пов'язана з встановленням їх вираженої біологічної активності, обумовленої структурою циклопентаноїдних монотерпенів різного ступеня окиснення. У рослинах ці сполуки синтезуються для захисту від комах-шкідників, внаслідок чого мають високу хімічну стабільність. Циклопентаноїдні монотерпени дуже розповсюджені в сировині родин *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae*, *Rubiaceae*, *Cornaceae*, *Eucommiaceae*, *Hobulariaceae*, *Gentianaceae* та підродин родини *Lamiaceae*: *Ajugoidae*, *Scutellarioidae*, *Stachyoidae* [5, 7, 10, 11, 14, 15]. Для найбільш відомого іридоїду аукубіну та його похідних встановлено виражену протизапальну, гепатопротекторну, антиоксидантну, протимікробну, ранозагоювальну дію [5, 10, 11, 13, 15].

Аукубін (син. аукубозид) ($C_{15}H_{22}O_9$) в індивідуальному стані представляє собою безбарвну кристалічну сполуку, М.м. 346.33, т. пл. 181 °С, $[\alpha]_D^{21} - 161.3^\circ$ (С = 1.6). Легко розчинний у воді та низькомолекулярних спиртах [5, 10, 11, 14].

Встановлено, що препарати з видів роду *Plantago* завдяки присутності аукубіну виявляють виражену протизапальну, стимулюючу, регулюючу обмін речовин, бактерицидну дію. В сучасній медицині такі препарати широко використовують при лікуванні гострого панкреатиту, циститу, пієлонефриту, в якості бактерицидних засобів при інфікуванні шлунка, кишкового тракту, нирок, січового міхура [5, 7, 13, 15].

Однак, слід зазначити, що стандартизація видів роду *Plantago* за вмістом аукубіну до нашого часу практично не проводилась. Відомі методи рідинної хроматографії і міцелярної електрокінетичної хроматографії досить складні у виконанні та некоректні через багатокомпонентний хімічний склад рослинної сировини та препаратів на її основі. До того ж вони потребують постійного використання стандартного зразка аукубіну [12, 14, 16].

Актуальною проблемою є впровадження в практику методу газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (ГХ-МС) для визначення вмісту іридоїдів у рослинній сировині та багатокомпонентних фітопрепаратах на її основі. Метод характеризується відносною швидкістю (35 хв), високою чутливістю (до 10^{-13} г), невеликим об'ємом проби

(0.1-0.5 мкл), невеликою відносною помилкою, можливістю широкого використання пошукових бібліотек [1].

Метою роботи було кількісне визначення аукубіну в листі досліджуваних видів роду *Plantago* і дослідження накопичення цієї сполуки під час цвітіння рослин в умовах України.

Експериментальна частина

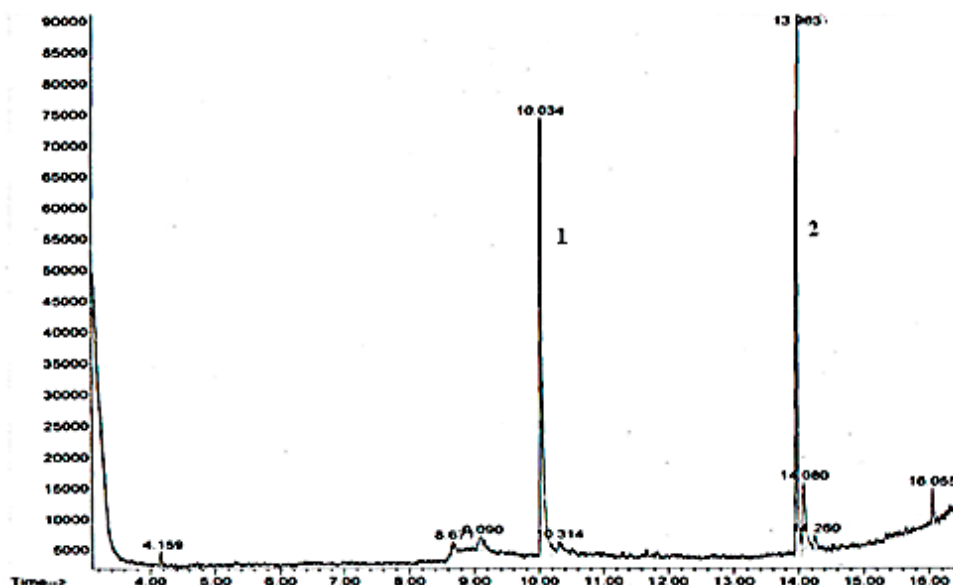
Об'єктом дослідження була рослинна сировина (листя) *P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L. та *P. altissima* L., яку заготовлено в різних регіонах України (2010-2013 рр.) у період цвітіння відповідно до вимог ГФ XI та ДФУ [2, 3].

Для ідентифікації аукубіну в досліджуваній рослинній сировині застосовували реакцію Трим-Хілла, а також реакцію з гідроксиламіном та хлоридом заліза(III). Для цього наважку (1.0 г) рослинної сировини, висушеної відповідно до вимог ДФУ, подрібнювали (d = 1 мм), додавали 10 мл 96 % спирту етилового, нагрівали на киплячій водяній бані протягом 15 хв, охолоджували, додавали 10 мл хлороформу, збовтували, розчинник відокремлювали. Витяг випаровували до 1 мл, додавали 2 мл реактиву Трим-Хілла.

В якості стандартного зразка використовували аукубін виробництва Fluka, Німеччина (> 99.0 %).

Кількісне визначення вмісту аукубіну в листі досліджуваних видів роду *Plantago* проводили методом ГХ-МС на хроматографі Agilent Technology 6890N/5973N з мас-спектрометричним де-

Рисунок 1



Хроматограма метанольного розчину аукубіну фірми Fluka (Німеччина)

1 — метанол, 2 — аукубін.

тектором 5973N, адаптованим для роботи з капілярними колонками в програмованому комп'ютерному режимі.

Методика: 0.5 г (точна наважка) подрібненої рослинної сировини ($d = 0.1$ мм) поміщали в мірну колбу місткістю 5 мл, додавали спирт метиловий 90 % до позначки, витримували 24 год ($t = 25$ °C). Розчин центрифугували, фільтрували крізь тефлоновий мембранний фільтр (діаметр отворів – 0.45 мкм) в пробірку для проведення аналізу.

Колонка кварцова, капілярна HP – 5MS розміром 30 м × 0.32 мм. Температура термостата – 50 °C у програмованому режимі (3 °C/хв до 220 °C), газ-носії – гелій. Температура детектора та випарювача – 250 °C. Швидкість потоку газу-носія (гелій) – 1.5 мл/хв. Введення проби з поділом потоку 1/50.

Аукубін визначали за результатами часу утримування піків компонентів і стандартного зразка, а також шляхом порівняння відповідних мас-спектрів з даними бібліотеки NIST02 (більше ніж 174000 сполук).

Результати досліджень та їх обговорення

Якісними реакціями Трим-Хілла та з гідроксиламіном і хлоридом заліза(III) було встановлено присутність іридоїдів у листі досліджуваних видів роду *Plantago*.

Результати кількісного визначення концентрації речовини методом ГХ-МС у досліджуваних видах роду *Plantago* флори України під час цвітіння (липень-червень, 2010-2013 рр.) наведено на Рис. 1 та в Табл. 1.

Встановлено, що аукубін під час цвітіння накопичується в листі всіх досліджуваних видів роду *Plantago* з різних місць зростання. Але при цьому спостерігали достовірно більш високі концентрації речовини в листі *P. altissima*. Відповід-

но в листі *P. lanceolata*, *P. media*, *P. major* ці показники були суттєво більш низькими. Різниця в концентраціях аукубіну в рослинній сировині, яку досліджували, в залежності від року її заготівлі та місця зростання була відносно невисокою та становила від (2.30±0.11) % до (2.57±0.13) %. Для рослинної сировини *P. lanceolata*, *P. major* та *P. media* відповідно: від (0.77±0.04) % до (0.91±0.04) %, від (1.22±0.05) % до (1.37±0.07) % та від (1.55±0.07) % до (1.86±0.09) %.

Отримані результати свідчать про необхідність стандартизації рослинної сировини видів роду *Plantago* методом ГХ-МС за накопиченням біологічно активного іридоїду аукубіну для всебічної оцінки її якості.

Висновки

1. Досліджено методом ГХ-МС визначення аукубіну в листі видів роду *Plantago* L.

2. Вміст аукубіну під час цвітіння рослин найбільший у листі *Plantago altissima* L.: від (2.30±0.11) % до (2.57±0.13) %, в залежності від року заготівлі та місця зростання.

3. Листя *P. media* L. та *P. altissima* L. найбільш перспективні для отримання фітопрепаратів протизапальної, ранозагоювальної, гепатопротекторної, антиоксидантної та протимікробної дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / Под ред. чл.-корр. НАН Украины В.П. Георгиевского. – Харьков: НТМТ, 2011. – Т. 2. – 474 с.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырьё / МЗ СССР. – [11-е изд., доп.]. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.

Таблиця 1

Вміст аукубіну в листі видів роду *Plantago*

Вид рослини	Місце заготівлі	Кількісний вміст, %, $(\bar{X} \pm \Delta\bar{X}), \mu = 6$
<i>P. major</i> L.	с. Підстепне, Херсонська обл., 2010 р.	1.37±0.07
<i>P. major</i> L.	м. Пириятин, Київська обл., 2011 р.	1.29±0.06
<i>P. major</i> L.	м. Ізюм, Харківська обл., 2012 р.	1.22±0.05
<i>P. media</i> L.	м. Барвінкове, Харківська обл., 2013 р.	1.70±0.07
<i>P. media</i> L.	м. Дружківка, Донецька обл., 2011 р.	1.55±0.07
<i>P. media</i> L.	м. Армянськ, АР Крим, 2012 р.	1.86±0.09
<i>P. lanceolata</i> L.	сmt. Кушугум, Запорізька обл., 2010 р.	0.91±0.04
<i>P. lanceolata</i> L.	с. Солене, Дніпропетровська обл., 2012 р.	0.77±0.04
<i>P. lanceolata</i> L.	м. Василівка, Запорізька обл., 2013 р.	0.80±0.04
<i>P. altissima</i> L.	м. Бахчисарай, АР Крим, 2011 р.	2.57±0.13
<i>P. altissima</i> L.	м. Кривий ріг, Дніпропетровська обл., 2012 р.	2.30±0.11
<i>P. altissima</i> L.	м. Краматорськ, Донецька обл., 2012 р.	2.44±0.11

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. / М.Д. Машковский. — М.: Новая волна, 2002. — Т. 1. — 540 с.
5. Оленников Д.Н. Подорожник большой (*Plantago major* L.) Химический состав и применение / Д.Н. Оленников, А.В. Samuelsen, Л.М. Танаева // Химия растительного сырья. — 2007. — № 2. — С. 37-50.
6. Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д.Н. [и др.]; под ред. Ю.Н. Прокудина. — К.: Наук. думка, 1987. — 548 с.
7. Питання введення до ДФУ національної монографії «Подорожника великого листя» / Е.Е. Котова [та ін.] // Фармаком. — 2010. — № 2. — С. 5-13.
8. Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства / Под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. — М.: ГЭО-ТАР — МЕД, 2002. — 288 с.
9. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С.К. Черепанов. — СПб., 1995. — 992 с.
10. Aucubin prevents loss of hippocampal neurons and regulates antioxidative activity in diabetic encephalopathy rats / H.Y. Xue, I. Jin, X.U. Li et al. // Phytother. Res. — 2009. — Vol. 23, № 7. — P. 980-986.
11. Chang I.M. Liver — protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine / I.M. Chang // Res Commun Mol Pathol Pharmacol. — 1998. — Vol. 102, № 2. — P.189-204.
12. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely — related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. / I.N. Beara, M.M. Lesjak, Z.O. Dejan et al. // Food Science and Technology. — 2012. — Vol. 47, № 1. — P. 64-70.
13. Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities / U. Kolak, M. Boga, E. Akalin Urusak et al. // Turk. J. Chem. — 2011. — № 35. — P. 637-645.
14. Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography / R. Jurisic, Z. Debeljak, S. Vladimir — Knezevic et al. // Z. Naturforsch. — 2004. — Vol. 59, № 1-2. — P. 27-31.
15. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species / L.C. Chiang, L.T. Ng, W. Chiang et al. // Planta Med. — 2003. — Vol. 69, № 7. — P. 600-604.
16. Risher M. Quantitative determination of the iridid glycosides aucubin and catapol in *Plantago lanceolata* L. / M. Risher, M. Adamchuk, H. Rats // J. of Planar Chromatography. — 1998. — № 11. — P.374-378.

УДК 581.19:547.918:582.933(477)

Резюме

Хортецька Т.В., Мазулін А.В., Буряк В.П., Еренко Е.К., Мазулін Г.В.
Запорізький державний медичний університет

Накопление аукубина в листьях видов рода *Plantago* L. флоры Украины

Целью работы было количественное определение аукубина в листьях исследуемых видов рода *Plantago* L. и исследование накопления этого вещества в период цветения растений в условиях Украины. Объектом исследования было растительное сырье (листья) *P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L. и *P. altissima* L., которое заготовлено в разных регионах Украины (2010-2013 гг.) в период цветения. Идентификацию и определение количественного содержания компонентов проводили с помощью хромато-масс-спектрометрии. Установлено присутствие и количественное содержание аукубина в листьях исследуемых видов рода *Plantago* L. флоры Украины. Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием впервые установлено, что наивысшие concentra-

ции вещества характерны для листьев *P. altissima* L. — до (2.57±0.13) %. Листья *P. media* L., *P. altissima* L., *P. major* L. перспективны для получения противовоспалительных лекарственных средств.

Ключевые слова: подорожник, аукубин, иридоид, газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, гепатопротекторное действие, антиоксидантное действие.

UDC 581.19:547.918:582.933(477)

Summary

ChortECKa T.V., Mazulin O.V., Burak V.P., Yerenko O.K., Mazulin G.V.
Zaporizhzhia state medical university

Aucubin accumulation in leaves of species of the genus *Plantago* L. of Ukrainian flora

The aim of the work was quantitative determination of aucubin in the leaves of species of the genus *Plantago* L. and study of its accumulation during the flowering period in Ukraine. The objects of study were the leaves of *P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L. and *P. altissima* L., which were harvested in 2010-2013 in different regions of Ukraine during flowering. As a standard sample aucubin produced by «Fluka», Germany, was used. Identification and quantitative determination of components were performed by chromatography-mass-spectrometry. Analysis was conducted on chromatograph «Agilent Technology 6890N/5973N». The spectra of the components were compared to those in mass-spectral library database NIST02 (more than 174000 substances). It was found that aucubin during flowering accumulates in the leaves of all studied species of the genus *Plantago* from different habitat. The difference in aucubin concentrations in the investigated herbal drugs, depending on the year of harvesting and habitat was relatively low and ranged from (2.30±0.11) % to (2.57±0.13) %. For herbal drugs *P. lanceolata* L., *P. major* L. and *P. media* L., the results were respectively, from (0.77±0.04) % to (0.91±0.04) %; from (1.22±0.05) % to (1.37±0.07) % and from (1.55±0.07) % to (1.86±0.09) %. These results provide the need for standardization of herbal drugs of species of the genus *Plantago*. Leaves of *Plantago* L. is a valuable plant material to produce antimicrobial and anti-inflammatory drugs.

Keywords: plantago, aucubin, iridoids, gas chromatography with mass-spectrometry, hepatoprotective action, antioxidative action.

Хортецька Тая Володимирівна. Асистент кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету (2011).

Еренко Олена Костянтинівна. К.фарм.н. (2013), асистент кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету (2011).

Мазулін Олександр Владиленич. Д.фарм.н. (1994), професор (2008), зав. кафедрою фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету.

Буряк Валерій Прокопович. Д.фарм.н. (1990), професор (1992), професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету.

Мазулін Георгій Владиленич. К.фарм.н. (2004), асистент кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету.

УДК 615.07:615.32

Хохлова К.О., Вишнеvsька Л.І., Котов А.Г., Кічимасова Я.С.

Національний фармацевтичний університет

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Стандартизація трави сухоцвіту багнового згідно вимог Державної Фармакопеї України

Визначено наявність сировинної бази трави сухоцвіту багнового на території України, широкий спектр фармакологічної дії цієї рослини і використання в народній медицині, що свідчить про актуальність фармакопейної стандартизації цієї сировини. Вивчено світовий досвід стандартизації трави с. багнового та проведено експериментальні дослідження на відповідність дослідних зразків трави с. багнового вимогам статті Державної Фармакопеї СРСР XI вид. «Трава сушениці топяної». Адаптовано ідентифікацію за макро- і мікроскопічними ознаками трави с. багнового. Проаналізовано і узагальнено дані літературних джерел щодо хімічного складу рослини й обрано речовини-маркери для її стандартизації. Розроблено методику ідентифікації речовин флавоноїдної природи з використанням тонкошарової хроматографії, проведено валідацію методики, виконано необхідні випробування і кількісне визначення, а також розроблено методику визначення екстрактивних речовин. Результати проведених досліджень можуть бути використані при підготовці проекту національної монографії «Сухоцвіту багнового трава» для включення у Державну Фармакопею України.

Ключові слова: сухоцвіту багнового трава, стандартизація, Фармакопея.

Використання стандартизованої вихідної лікарської рослинної сировини (ЛРС) є однією з головних вимог для отримання лікарських засобів (ЛЗ) рослинного походження належної якості. Документом, що регламентує якість ЛРС в Україні, є монографія Державної Фармакопеї України (ДФУ) [5-7, 10-11]. Тому важливим питанням забезпечення населення України якісними, безпечними та ефективними ЛЗ рослинного походження є введення монографій на ЛРС у ДФУ.

Сухоцвіт багновий (*Gnaphalium uliginosum* L.) — однорічна трав'яниста рослина з род. айстрових (*Asteraceae*); рос. назва: сушеница топяная; син.: сухоцвіт болотний; народна назва: сухоцвітки, жаб'яча трава. Рослина сірувато-зеленого кольору, сіра або білувата через нерівноклочкуватощерстисте опушення. Зустрічається майже по всій території України, але на сході та півдні — рідко. У великих кількостях зростає у низькогір'ї Карпат, Закарпатті, Прикарпатті, Розточчі-Опіллі, а також у басейні р. Дніпро на вологих річкових пісках і в пониженнях других терас, рідше — у басейні р. Сіверський Донець. Зростає на вологих, болотистих місцях, по берегах річок, рівчаків, вологих луках, узбіччях доріг, схилах з підтіканням ґрунтових вод, рідше — як бур'ян на полях і городах. Запаси сировини великі. Щорічно можна заготовляти десятки тонн трави. Промислову заготовку можна проводити в Закарпатській, Львівській, Івано-Франківській, Чернівецькій, Тернопільській, Волинській, Рівненській, Житомирській, Київській, Чернігівській, Сумській, Харківській та інших областях [15].

З лікувальною метою використовують траву с. багнового, заготовлену у період цвітіння рос-

лини. Для відновлення заростей на ділянці, де заготовляють сировину, треба залишати на 1 м² по 2-4 рослини. Обтрушують ґрунт із рослин, вирваних із коренем, і сушать їх на сонці або під укриттям, якщо погодні умови несприятливі. Штучне сушіння проводять при температурі не вище 40 °С. Вихід сухої трави — 25-30 %. Готову сировину запаковують у полотняні мішки і зберігають на стелажах у сухому провітрюваному приміщенні. Термін придатності — 3 роки. Трава сухоцвіту є у продажу в аптеках.

Трава сухоцвіту виявляє гіпотензивну дію, переважно за рахунок розширення периферичних судин (гнафалозиди, терпеноїди); седативну дію, що у кілька разів сильніша, ніж у валеріани (флавоноїди, терпеноїди, невідомі сполуки); полівітамінну, протимікробну (флавоноїди, крезоли, таніни, терпеноїди), протизапальну та репаративну дії (ті самі чинники, ескуліноподібні сполуки, невідомі сполуки); в'язучу (таніни), кардіотонічну (гнафалозиди) дії. У медицині сухоцвіт застосовують у кардіології при гіпертензіях, ефект досягається завдяки седативному впливу та розширенню периферичних судин. Також сухоцвіт використовують при облітеруючому ендартеріїті (початкова стадія), вегетосудинних дистоніях. Під впливом настоїв сповільнюється ритм серця, збільшується хвилинний об'єм, зменшується або зникає серцевий біль. Рослина показана при стенокардії, атеросклерозі, кардіоневрозах, безсонні, серцебитті, загальному збудженні [12].

Крім того, олійні екстракти сухоцвіту посилюють репаративні процеси в тканинах. Настій сухоцвіту є ефективним засобом для лікування виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки (зникають болі, покращується загальне

самопочуття, хворі набирають вагу). У гомеопатії есенцію застосовують при нейроциркуляторній дистонії, виразковій хворобі шлунка. У народній медицині — при серцевій недостатності, гепатиті, нирковокам'яній хворобі, цукровому діабеті, тонзиліті, ангіні, туберкульозі легень, злоякісних пухлинах, алергіях, паралічі, асциті, дерматомікозах; зовнішньо (мазь на льняній олії) — при опіках. У практичній медицині — при тромбофлебитах, флеботромбозах, ендартеріїтах; відвар, екстракт — при ерозії шийки матки; у стоматології олійний екстракт — при афтозному, виразковому, ерозійному стоматиті, хімічних опіках ротової порожнини і пародонтозах, припарки — у дерматології і косметичці; у зборах — як спазмолітичний, гемостатичний, в'язучий засіб, що регулює моторну функцію шлунка і дванадцятипалої кишки, при бактеріальній і амебній дизентерії, геморої, бешихових запаленнях; інгаляції — при хронічному гаймориті [12, 15].

На цей момент у ДФУ відсутня монографія на рослину сировину сухоцвіту багнового, також відсутня така монографія і в Європейській фармакопеї (ЄФ). Якість трави с. багнового регламентує Державна Фармакопея СРСР (ГФ) XI вид. [4]. Статті на цю сировину наявні також у ГФ X і IX вид. [2, 3].

Широкий спектр фармакологічної дії трави с. багнового, а також наявність ЛЗ на основі цієї

сировини на фармацевтичному ринку України свідчать про актуальність стандартизації трави с. багнового.

Метою цієї роботи є стандартизація трави с. багнового. Дослідні зразки сировини заготовляли у період цвітіння у Закарпатській (с. 130012), Харківській, Волинській, Сумській, Вінницькій (с. 109512) областях і у Криму; усього в роботі використані 7 зразків 2010-2012 рр. заготівлі.

При проведенні експериментальних робіт використовували фізичні та фізико-хімічні методи дослідження, методи фармакогнозії [1, 5-7]. Для дослідження використовували стандартні зразки (СЗ) належної якості: рутин, гіперозид, вітексин (ФСЗ ДФУ), хлорогенову кислоту (Acros Organics); пластинки для тонкошарової хроматографії (ТШХ) і високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) (Merck і Macherey-Nagel, Німеччина). Всі реактиви готували відповідно до вимог ДФУ і використовували свіжоприготованими.

Стандартизацію трави с. багнового проводили, беручи за основу підхід ЄФ/ДФУ [9-11], а також враховуючи загальний формат і стиль монографій на ЛРС у ДФУ і комплексне вивчення вимог статті «Трава сушениці топяной» ГФ XI, X і IX видань. Проведено дослідження основних показників якості трави с. багнового на відповідність вимогам ГФ XI, враховуючи національні особливості культивування сировини.

Таблиця 1

Результати досліджень діагностичних мікроскопічних ознак сухоцвіту багнового трави відповідно до ГФ XI

Вимоги ГФ XI	Результати аналізу (для зразків 1-7)
Верхня епідерма листків (вигляд зверху) із паренхімних клітин зі слабо звивистими оболонками.	Відповідає.
Нижня епідерма листків із паренхімних клітин з більш звивистими оболонками.	Відповідає.
Великі, овальні, занурені продири, з 4-5 біляпродиховими клітинами; тип продирихового апарату — аномоцитний, зустрічається зрідка на фрагментах верхньої і часто на фрагментах нижньої епідерми листка.	Відповідає.
Чисельні покривні волоски, складаються з (1-3) базальних клітин і довгої тонкостінної звивистої апікальної клітини.	Волоски покривні, дуже довгі, сплутані між собою; складаються з (1-3) базальних видовжених клітин і довгої тонкостінної звивистої апікальної клітини. Не відповідає.
Зустрічаються голівчасті волоски з одноклітинною ніжкою і багатоклітинною видовжено-овальною голівкою; клітини голівки розташовані в один або два ряди.	Зустрічаються голівчасті волоски з (2-3)-клітинною ніжкою і багатоклітинною видовжено-овальною невеликою голівкою.
Не описано.	Зустрічаються великі клітини (1-2)-шарової кутової колєнхіми; клітини корової парєнхіми з великими міжклітинниками. Зустрічаються широко- та вузько- просвітні спіральні і пористі судини; ділянки склерєнхіми. Зустрічаються великі зірчасті друзи.

Макроскопія. У статті ГФ XI «Трава сушениці топяної» наведено детальний морфологічний опис стебла (забарвлення, форма, опушення), коренів, листка (розташування, форма верхівки, центральна жилка тощо) та суцвіття (тип, розмір, розташування тощо), обгортки (форма, забарвлення листочків, опушення тощо), квіток (тип, розмір, забарвлення тощо), плодів (тип).

Порівняльний аналіз визначення і морфологічної будови досліджуваних зразків трави с. багнового показав їх відповідність за усіма ознаками статті ГФ XI. Стаття на сухоцвіт багновий з ГФ X і ГФ IX описує можливі домішки інших рослин: с. лісовий (*Gnaphalium sylvaticum* L.) і жабник польовий (*Filago arvensis* L.). У цих фармакопєях наведено макро- і мікроскопічні ознаки, які дають змогу відрізнити домішки від с. багнового [2, 3].

Мікроскопія. Мікроскопічний аналіз зразків трави с. багнового виявив їх відповідність статті ГФ XI «Трава сушениці топяної». Вивчали анатомічну будову листка с. багнового. Також нами було визначено діагностичні ознаки стебла с. багнового, які не описані у ГФ XI. Результати аналізу мікроскопічних ознак трави с. багнового на відповідність статті ГФ XI «Трава сушениці топяної» наведено у Табл. 1.

З метою гармонізації вимог до проведення мікроскопічного аналізу до вимог ДФУ проводили випробування досліджуваних зразків трави с. багнового на подрібненій на порошок сировині. Переглядали порошок під мікроскопом, використовуючи *хлоральгідрату розчин Р*. У порошок виявилися всі основні діагностичні ознаки, що були виявлені під час роботи зі зразками сировини.

Ідентифікація якісного складу. Вивчення фітохімічного складу с. багнового проводили ряд дослідників [8, 13-17]. За даними літератури трава с. багнового містить флавоноїди: похідні флавонолу (кверцетину, кемпферолу, рамнетину, ізорамнетину) і флавону (лютеоліну, апігеніну, скутелареїну, специфічні флавоногнафалозиди А і В), кумарини, каротиноїди, дитерпенові дикарбонові кислоти, вітаміни та ін. [15].

Оскільки для ЄФ і ДФУ, на відміну від ГФ XI, метод ТШХ при розробці монографій на ЛРС є майже обов'язковим [10, 11], для стандартизації трави с. багнового необхідно було розробити методику ідентифікації з використанням методу ТШХ. Як клас біологічно активних речовин для ідентифікації с. багнового нами було обрано речовини флавоноїдної природи (похідні флавонолу і флавону), які є характерними для трави цієї рослини [13, 17]. Речовини флавоноїдної природи відповідають за гіпотен-

зивну, антиоксидантну і протизапальну дію досліджуваної сировини [15].

Розробка та валідація методу ідентифікації речовин флавоноїдної природи трави сухоцвіту багнового

Розробку методики ідентифікації за допомогою ТШХ і вивчення її валідаційних характеристик проводили одночасно. При розробці методики проводили вибір стаціонарної і рухомої фаз, підбирали оптимальну пробопідготовку, вибирали спосіб детектування, процес нанесення зразка та ін. Вивчали валідаційні параметри: специфічність і робастність.

Стаціонарна фаза. Як стаціонарну фазу використовували ТШХ пластинки з силікагелем у якості сорбенту. Визначали вплив ТШХ пластинок різного виробництва: «Alugram» Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Німеччина) і Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck, Німеччина), на хроматографічний профіль досліджуваних зразків с. багнового та на коливання значень R_f , що виявляються на рівні зон розчину порівняння (Рис. 1, 2).

Рухома фаза. Застосовували рухому фазу, яка широко використовується для аналізу речовин флавоноїдної природи [18, 20]: *етилацетат Р - оцтова кислота Р - мурашина кислота безводна Р - вода Р* (100:11:1:1:27).

Пробопідготовка. Порівнювали результати хроматографування, використовуючи як випробовуваний розчин 0.1 % етанольний витяг (50 %, об/об) с. багнового (ВР1), і випробовуваний розчин с. багнового, отриманий за пробопідготовкою, яка наведена нижче (ВР2) (Рис. 3).

Випробовуваний розчин ВР2. До 2.0 г здрібненої на порошок сировини додають 20 мл *етанолу* (50 %, об/об) *Р*, нагрівають на водяній бані при температурі 65 °С зі зворотним холодильником або в ультразвуковій бані при кімнатній температурі протягом 15 хв, охолоджують і фільтрують. 10.0 мл фільтрату поміщають у діляльну ліжку місткістю 50 мл, додають 10 мл *хлороформу Р* й екстрагують протягом 1 хв. Після повного поділу шарів *хлороформний витяг* відкидають. У діляльну ліжку додають 15 мл *етилацетату Р* і екстрагують протягом 1 хв. Після поділу шарів нижній (водний) шар відокремлюють і видаляють. Верхній шар переносять у колбу, упарюють на водяній бані і відганяють *етилацетат* під вакуумом при залишковому тиску 12-16 кПа. До залишку додають 1 мл *метанолу Р* і перемішують.

Хроматографування. Хроматографування проводили відповідно до ДФУ «2.2.27. Тонкошарова хроматографія» [5].

Нанесення зразка. У ході роботи порівнювали результати, отримані при нанесенні ВР1 у кількості 25 мкл і ВР2 у кількості 5 мкл, 10 мкл, 15 мкл і 20 мкл; плями наносили за допомогою мікрошприца, смугами 10 мм × 2 мм; відстань між смугами — 0.5 см. Встановлено, що оптимальний об'єм нанесення складає 15 мкл для випробовуваного розчину, 10 мкл для розчину порівняння (Рис. 1).

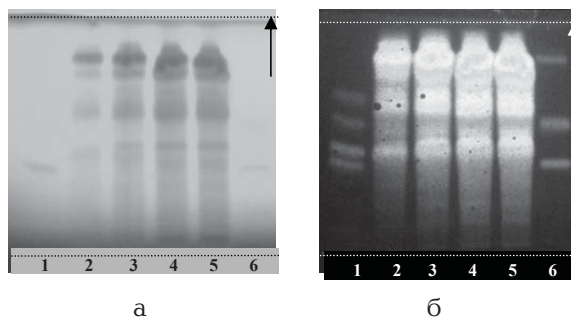
Відстань для хроматографування. Порівнювали вплив відстані, що має пройти рухома фаза: (8-8.5) см і 12 см. Результати наведено на Рис. 2. Аналіз Рис. 2 дозволяє стверджувати, що для розділення сполук достатньо відстані для хроматографування (8-8.5) см. Це дозволяє при проведенні дослідження більш раціонально використовувати ТШХ пластинки, зменшує необхідну кількість органічних розчинників для рухомої фази і проблему утилізації їх залишків, дозволяє скоротити час проведення аналізу, зменшує необхідну кількість реактивів-проявників, отже, дозволяє оптимізувати економічні затрати.

Специфічність. У якості розчину порівняння нами було обрано суміш СЗ рутину і гіперозиду (1.0 мг кофейної кислоти Р, 2.5 мг гіперозиду і 2.5 мг рутину у 10 мл метанолу Р). Також при проведенні експерименту використовували суміш СЗ хлорогенової кислоти, гіперозиду, рутину і вітексину (1 мг хлорогенової кислоти, 2.5 мг гіперозиду і 2.5 мг рутину, 2.5 мг вітексину у 10 мл метанолу Р).

Детектування. Спочатку пластинку переглядали в УФ-світлі при 254 нм для з'ясування особливостей хроматографічного профілю та виявлення речовин, що поглинають. Потім гарячу пластинку обприскували реактивами-проявниками, специфічними для виявлення фенольних сполук, зокрема фенілпропаноїдів та дифенілпропаноїдів: розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрополу 400 Р у метанолі Р, сушили на повітрі протягом 30 хв і переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі розчину порівняння у середній частині мають виявлятися три зони, у порядку зростання R_f: зона жовтаво-оранжевої флуоресценції (рутин), зона жовтаво-оранжевої флуоресценції (гіперозид), у верхній частині: зона блакитної флуоресценції (кофейна кислота). На хроматограмі випробовуваного розчину вище зони, що відповідає рутину на хроматограмі розчину порівняння, має виявлятися слабка жовтаво-оранжева зона, вище неї інтенсивна блакитна флуоресціююча зона

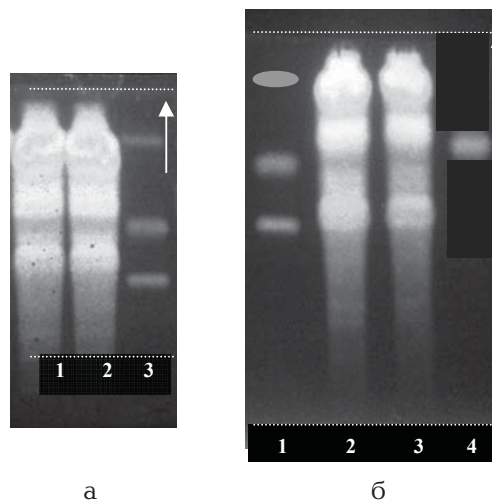
Рисунок 1



Ідентифікація речовин флавоноїдної природи трави сухоцвіту багнового. Вибір об'єму аликвоти

Примітки:
 ТШХ пластинка — Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck);
 Відстань для хроматографування — 8.5 см;
 а — УФ-254 нм, до проявлення;
 б — УФ-365 нм, після проявлення;
 1 — розчин порівняння (рутин, хлорогенова кислота, гіперозид, вітексин, знизу вверху);
 2 — випробовуваний розчин с. багнового, 5 мкл;
 3 — випробовуваний розчин с. багнового, 10 мкл;
 4 — випробовуваний розчин с. багнового, 15 мкл;
 5 — випробовуваний розчин с. багнового, 20 мкл;
 6 — розчин порівняння (рутин, гіперозид, кофейна кислота, знизу вверху), 10 мкл.

Рисунок 2



Вплив відстані, що має пройти рухома фаза (перегляд в УФ-світлі при 365 нм)

Примітки:
 а — 8.5 см;
 б — 12 см;
 1, а — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 6, 15 мкл;
 2, а — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 6, 20 мкл;
 3, а — розчин порівняння (рутин, гіперозид, кофейна кислота, знизу вверху), 10 мкл;
 1, б — розчин порівняння (рутин, гіперозид, кофейна кислота, знизу вверху), 10 мкл;
 2, б — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 6, 20 мкл;
 3, б — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 6, 15 мкл;
 4, б — розчин порівняння ізокверцитрину, 10 мкл.

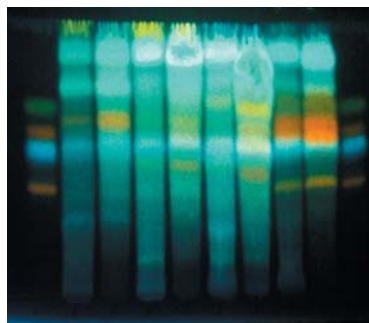
(хлорогенова кислота), дещо нижче і дещо вище зони, що відповідає гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, мають виявлятися 1 або 2 жовтаво-оранжеві зони. У верхній частині хроматограми випробовуваного розчину на рівні зони, що відповідає кофейній кислоті на хроматограмі розчину порівняння, має виявлятися інтенсивна блакитна флуоресціююча зона, нижче неї мають виявлятися жовтаво-оранжева зона і блакитна флуоресціююча зона. Крім того, на хроматограмі випробовуваного розчину також можуть виявлятися інші зони.

Достовірність визначення домішок. Вивчали можливість визначення недопустимої домішки жабника польового на одній хроматографічній пластинці в умовах методики. Для цього на одну хроматографічну пластинку паралельно з ВР1 і ВР2 наносили випробовувані розчини можливої недопустимої домішки с. багнового — жабника польового. Випробовувані розчини ж. польового були приготовані аналогічно ВР1 і ВР2. Описували отримані результати хроматографування за відношенням до обраних СЗ: колір, інтенсивність забарвлення, розташування на пластинці. Результати наведено на Рис. 3.

Як свідчить аналіз одержаних хроматограм (Рис. 3), досліджувані зразки трави с. багнового виявляють близький хроматографічний профіль речовин флавоноїдної природи за відношенням до обраних СЗ, що підтверджує специфічність визначення. В умовах методики до-

сити складно виявити недопустиму домішку с. багнового — жабник польовий, оскільки хроматографічні профілі ж. польового (зразок № 3) і с. багнового (зразки № 5, № 7) дуже близькі. Проте, смуга жовтого кольору, що виявляється

Рисунок 3



Ідентифікація речовин флавоноїдної природи сухоцвіту багнового трави і домішки жабника польового

Примітки:

ТШХ-пластинка — «Alugram» Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel);

Відстань для хроматографування — 8.5 см;

Перегляд — в УФ-світлі при 365 нм;

- 1 — розчин порівняння (рутин, хлорогенова кислота, гіперозид, вітексин, знизу вверху);
- 2 — етанольний витяг ж. польового;
- 3 — випробовуваний розчин ж. польового;
- 4 — етанольний витяг с. багнового, зразок № 1;
- 5 — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 1;
- 6 — етанольний витяг с. багнового, зразок № 6;
- 7 — випробовуваний розчин с. багнового, зразок № 7.

Таблиця 2

Результати аналізу сухоцвіту багнового трави відповідно до статті ГФ ХІ «Трава сушениці топяной»

Показник	Нормування	Зразок трави сухоцвіту багнового						
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
Органічні домішки, %	Не більше 2	1.4±0.26	1.4±0.11	0.8±0.07	0.5±0.07	—	1.5±0.07	0.7±0.01
		+	+	+	+	+	+	+
Мінеральні домішки, %	Не більше 2	—	—	—	—	0.5±0.01	—	—
		+	+	+	+	+	+	+
Втрата в масі при висушуванні, %	Не більше 12.0	7.7±0.23	6.4±0.26	6.5±0.14	7.0±0.31	7.0±0.27	6.9±0.13	6.0±0.14
		+	+	+	+	+	+	+
Загальна зола, %	Не більше 20.0	16.7±0.5	17.3±0.35	10.0±0.48	15.0±0.3	16.3±0.07	16.4±0.04	18.4±0.11
		+	+	+	+	+	+	+
Зола, нерозчинна у 10 % розчині НСІ, %	Не більше 10.0	3.73±0.08	5.1±0.02	3.63±0.34	2.7±0.18	3.41±0.22	3.2±0.02	6.6±0.27
		+	+	+	+	+	+	+
Кількісне визначення	Не менше 0.2 % суми флавоноїдів у перерах. на гнафалозид А (СФ)	0.35±0.02	0.4±0.01	0.45±0.02	0.42±0.01	0.43±0.01	0.48±0.01	0.31±0.02
		+	+	+	+	+	+	+

Примітка. «+» — відповідає вимогам; «-» — домішку не виявлено.

на хроматограмах розчинів с. багнового нижче смуги хлорогенової кислоти на хроматограмі розчину порівняння, є характерною. Для більш впевненої ідентифікації домішка ж. польового має бути встановлена на стадії макроскопічного аналізу сировини.

Робасність. Як видно з Рис. 1-3, при застосуванні обраної рухомої фази на усіх використовуваних ТШХ пластинках виявлено збіжні результати хроматографічного профілю досліджуваних зразків трави с. багнового відносно обраних СЗ (значення R_f , послідовність розташування, розмір, інтенсивність забарвлення тощо).

Випробування і кількісне визначення. Визначення втрати в масі при висушуванні, загальної золи, золи, нерозчинної у 10 % розчині кислоти хлористоводневої, сторонніх домішок і кількісне визначення зразків трави с. багнового проводили відповідно до статті ГФ XI «Трава сушениці топяной». Результати аналізу наведені у Табл. 2.

За показниками «Органічні домішки», «Мінеральні домішки», «Втрата в масі при висушуванні», «Загальна зола», «Зола, нерозчинна у 10 % розчині кислоти хлористоводневої» і «Кількісне визначення» усі зразки трави с. багнового відповідають вимогам статті ГФ XI «Трава сушениці топяной».

Наведена у ГФ XI методика кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гнафалозид А є недостовірною. Як показали описані вище дослідження, сировина містить не лише похідні метильованих флавоноїдів, а й цілу низку фенольних сполук, які неможливо оцінити за спектром поглинання стандартного зразка гнафалозиду. Тому для контролю кількісних показників с. багнового нами запропоновано проводити визначення суми речовин, що екстрагуються водою. Методика визначення екстрактивних речовин розроблена з урахуванням показання до застосування трави с. багнового (настій) і методик визначення, наведених в монографіях ЄФ на ЛРС [19]. Методика наведена нижче.

Речовини, що екстрагуються водою: не менше 10 %. До 4.0 г подрібненої на порошок сировини додають 100 мл гарячої води Р. Настояють протягом 15 хв, періодично перемішуючи, охолоджують. Фільтрують, доводять водою Р до 100 мл. 10 мл одержаного фільтрату упарюють на водяній бані насухо та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси.

Результати визначення речовин, що екстрагуються водою, у зразках трави с. багнового наведено у Табл. 3.

Таблиця 3

Вміст екстрактивних речовин у траві сухоцвіту багнового

№ зразка	Вміст екстрактивних речовин, %	Нормування – не менше 10 %
1	12.88 ± 0.07	<i>Vignovigae</i>
2	15.85 ± 0.02	<i>Vignovigae</i>
3	10.41 ± 0.06	<i>Vignovigae</i>
4	14.03 ± 0.09	<i>Vignovigae</i>
5	13.99 ± 0.06	<i>Vignovigae</i>
6	12.67 ± 0.05	<i>Vignovigae</i>
7	16.45 ± 0.02	<i>Vignovigae</i>

Висновки

1. Визначено наявність на території України сировинної бази трави сухоцвіту багнового (*Gnaphalium uliginosum* L.).

2. Проведено стандартизацію трави с. багнового згідно вимог ДФУ, що включає:

— експериментальні дослідження на відповідність дослідних зразків трави с. багнового вимогам статті ГФ XI «Трава сушениці топяной»;

— адаптацію ідентифікації за макро- і мікроскопічними ознаками трави с. багнового, визначення втрати в масі при висушуванні сировини, вмісту загальної золи і золи, нерозчинної в хлористоводневій кислоті, сторонніх домішок і кількісного вмісту у перерахунку на гнафалозид;

— розробку методики ідентифікації речовин фенольної природи методом ТШХ і проведення валідації цієї методики, а також розробку методики визначення екстрактивних речовин.

3. Результати проведених досліджень будуть використані при підготовці проекту національної монографії ДФУ «Сухоцвіту багнового трава».

ЛІТЕРАТУРА

- Атлас з анатомії рослин (рослинна клітина, тканини, органи): навч. посіб. для студентів вищих навчальних закладів / А.Г. Сербін, Л.С. Карамазова, В.П. Руденко, Т.М. Гонтова. — Х.: Колорит, 2006. — 86 с.
- Трава сушениці топяной // Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. — IX изд. — М.: Медгиз, 1961. — С. 239.
- Трава сушениці топяной // Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. — X изд. — М.: Медицина, 1968. — С. 345-346.
- Трава сушениці топяной // Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. — 11-е изд., вып. 2. доп. — М.: Медицина, 1990. — С. 320-323.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості

- лікарських засобів». — 1-е вид. — Доповнення 3. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. — 280 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 1-е вид. — Доповнення 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — 540 с.
8. Коноплева М.М. Исследование биологически активных соединений сушеницы топяной и разработка метода стандартизации лекарственного растительного сырья: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. фармац. наук: спец. 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» / М.М. Коноплева. — М., 1980. — 19 с.
9. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослину сировину до Державної Фармакопеї України / А.Г. Котов // Фармаком. — 2009. — № 1. — С. 5-19.
10. Котов А.Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослину сировину. Ч. 1 / А.Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2011. — № 6 (20). — С. 16—22.
11. Котов А.Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослину сировину. Ч. 2 / А.Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2012. — № 1 (21). — С. 4-10.
12. Лікарські рослини: енциклопедичний довідник / за ред. А.М. Гродзинського. — К.: Голов. ред. УРЕ, 1990. — 544 с.
13. Новый ацилированный флавоновый гликозид из *Gnaphalium uliginosum* / М.М. Коноплева, Л.П. Смирнова, В.И. Глызин и др. // Химия природных соединений. — 1979. — № 3. — С. 311-315.
14. Николашкин А.Н. Разработка показателей качества травы сушеницы топяной / А.Н. Николашкин, О.Г. Потанина, Д.М. Попов и др. // Фармация. — 2010. — № 4. — С. 19-21.
15. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). — СПб.: Наука, 1993. — Т. 7. — 352 с.
16. Николашкин А.Н. Совершенствование стандартизации травы сушеницы топяной / А.Н. Николашкин, О.Г. Потанина, Д.М. Попов и др. // Фармация. — 2010. — № 2. — С. 12-14.
17. Коноплева М.М. Содержание флавоноидов в сушенице топяной / М.М. Коноплева, Л.П. Смирнова, В.И. Глызин и др. // Хим.-фарм. журн. — 1981. — Т. 15, № 2. — С. 72-76.
18. Хохлова К.О. Застосування тонкошарової хроматографії для ідентифікації кардіологічного фітозасобу / К.О. Хохлова, Л.І. Вишнеvsька // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика. — 2012. — Вип. 21, Кн. 4. — С. 479-485.
19. European Pharmacopoeia. — 6th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2007. — 3261 p.
20. HPTLC identification of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) F-22B [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/camag_laboratory/methods.cfm.

УДК 615.07:615.32

Резюме

Хохлова Е.А., Вишневская Л.И., Котов А.Г., Кичимасова Я.С. Национальный фармацевтический университет Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Стандартизация травы сушеницы топяной в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины

Определены наличие сырьевой базы травы сушеницы топяной на территории Украины, широкий спектр фармакологического действия данного растения и использование в народной медицине, что свидетельствует об акту-

альности фармакопейной стандартизации данного сырья. Изучен мировой опыт стандартизации травы с. топяной и проведены экспериментальные исследования на соответствие опытных образцов травы с. топяной требованиям статьи Государственной Фармакопеи СССР XI изд. «Трава сушеницы топяной». Адаптирована идентификация по макро- и микроскопическим признакам травы с. топяной. Проанализированы и обобщены данные литературных источников о химическом составе растения и выбраны вещества-маркеры для его стандартизации. Разработана методика идентификации веществ флавоноидной природы с использованием тонкослойной хроматографии, проведена валидация методики, выполнены необходимые тесты и количественное определение, а также разработана методика определения экстрактивных веществ. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при подготовке проекта национальной монографии «Сушеница топяной трава» для включения в Государственную Фармакопею Украины.

Ключевые слова: сушеницы топяной трава, стандартизация, Фармакопея.

UDC 615.07:615.32

Khokhlova K.O., Vyshnevskaya L.I., Kotov A.G., Kichimasova Ya.S. National University of Pharmacy State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»

Low cudweed grass standardization according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine

This work was devoted to pharmacopoeial standardization of herbal raw material — Low Cudweed grass. The presence of raw materials base in the territory of Ukraine, the wide spectrum of pharmacological activity of the raw material, its use in the folk medicine, indicate that the pharmacopoeial standardization of Low Cudweed grass is actual. The investigations of world experience of standardization of Low Cudweed grass and experimental studies of accordance of raw material of Low Cudweed to monographs of the State Pharmacopoeia of Soviet Union have been conducted. Identification of macro- and microscopy characters of Low Cudweed grass has been adapted. The literature data about chemical composition of Low Cudweed grass have been analyzed and summarized. The marker substances for standardization of Low Cudweed grass have been chosen. The method of Thin-layer chromatography (TLC) of flavonoids has been developed and validated. The required tests and assay have been determined and the method of determination of extractable matters has been developed. The obtained results can be used for preparation of national monograph's draft «Low Cudweed grass» for including to the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Keywords: Low Cudweed grass, standardization, Pharmacopoeia.

Хохлова Катерина Олександрівна. К.фарм.н., асистент кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету.

Вишнеvsька Лілія Іванівна. Д.фарм.н., професор, зав. кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету.

Котов Андрій Георгійович. Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). Заст. нач. відділу ДФУ ДП «Фармакопейний центр». Д.фарм.н. (2014).

Кичимасова Яна Сергіївна. К.фарм.н., доцент кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету.

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 615.07

Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова Е.В.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»
Национальный фармацевтический университет

Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения. Сообщение 2

Окончание. Начало см. «Фармаком» № 1, 2014.

Статья продолжает серию исследований, посвященных разработке стандартизованных процедур валидации фармакопейных методик контроля качества лекарственных средств. Разработана метрологически обоснованная стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения в варианте метода показателя поглощения. Процедура успешно апробирована на фармакопейной методике количественного определения субстанции преднизолона. Показана метрологическая некорректность некоторых фармакопейных методик количественного определения в варианте метода показателя поглощения.

Ключевые слова: спектрофотометрия, метод показателя поглощения, валидация, количественное определение.

9. Критерии линейности

Изучение линейности целесообразно проводить, как обычно, на 9 точках ($g = 9$) [9].

9.1. Остаточное стандартное отклонение RSD_0

Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой $Y_i = b \times X_i + a$ равен $t(95\%, g-2) \times RSD_0$ и представляет собой доверительный интервал неопределенности анализа собственно образца Δ_{prec} , который должен удовлетворять неравенствам (19-23). Учитывая это, а также [8], получим:

Субстанции:

$$\Delta_{prec} = t(95\%, g-2) \times RSD_0 = 1.89 \times RSD_0 \leq 0.71 \times B. \quad (25)$$

ГЛС, ЛРС:

$$\Delta_{prec} = 1.89 \times RSD_0 \leq 0.23 \times B. \quad (26)$$

Отсюда получим требования к величине RSD_0 ($g = 9$):

Субстанции:

$$RSD_0 \leq 0.37 \times B. \quad (27)$$

ГЛС, ЛРС:

$$RSD_0 \leq 0.12 \times B. \quad (28)$$

В случае тестов «Однородность содержания» и «Растворение» предельная неопределенность анализа $\max \Delta_{As} = 3.0\%$, что соответствует формальным допускам содержания $B = 9.3\%$ [9]. Данную величину и следует подставлять для данных тестов в соотношениях (27-28).

9.2. Коэффициент корреляции

Коэффициент корреляции рассчитывают по формуле [8]:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{RSD_0^2}{RSD_{range}^2}}. \quad (29)$$

Использование нормализованных координат и соотношений (27-28) и значений RSD_{range} (стандартное отклонение концентраций всех модельных растворов в нормализованных координатах [9]) позволяет получить критерии приемлемости для R_c . Учитывая высокие значения R_c , целесообразно вместо них регламентировать величины R_c^2 . Такие расчеты представлены в Табл. 3.

9.3. Свободный член линейной зависимости

Свободный член (a) прямой (13) характеризует систематическую погрешность. В соответствии с [9], требования к нему могут быть двух типов:

1. *Статистически* незначимое отличие от нуля: величина a должна быть меньше доверительного интервала своей неопределенности, т.е. ($g = 9$):

Статистическая незначимость:

$$a \leq t(95\%, g-2) \times s_a = 1.89 \times s_a. \quad (30)$$

Здесь:

s_a — стандартное отклонение свободного члена прямой (a), найденное методом наименьших квадратов.

2. Приемлемое значение свободного члена. Данное понятие в случае МПП заменяет понятие «Практическая незначимость свободного члена», которое применяется для метода стандарта [9].

В случае метода стандарта свободный член является незначимым, если вносимая им систематическая погрешность является незначимой по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$. В случае МПП на стадии разработки методики это требование также применимо, и реализацией его является соотношение (15).

Однако на стадии валидации методики МПП для внешнего анализа (т.е. на другом спектрофотометре) приходится считаться, как это показано в п. 7.2, с систематической погрешностью Δ_A , которая может достигать, в соответствии с Табл. 2, очень больших величин.

Систематической погрешности Δ_A (которая является главной частью полной систематической погрешности Δ_{tot}) соответствует свободный член $a_{\Delta A}$, абсолютное значение которого, с учетом (18), отвечает соотношению:

$$|a_{\delta A}| \leq \max \delta_A \leq \max \delta_{tot} = 0.71 \times \max \Delta_{As}. \quad (31)$$

Из сравнения соотношений (15) и (31) видно, что $a_{\Delta A}$ зависит только от $\max \Delta_{As}$, в то время как a_{line} зависит также от диапазона, т.е. X_L . Величины a_{line} и $a_{\Delta A}$ носят случайный характер по отношению друг к другу, поэтому требования к результирующему свободному члену a имеют вид [8]:

Требование приемлемости:

$$|a| \leq \sqrt{\max a_{line}^2 + \max a_{\delta A}^2}. \quad (32)$$

Говорить о практической незначимости свободного члена a в случае МПП (соотношение (32)) нельзя. Аналогичная ситуация в методе калибровочного графика [7]. Правильнее говорить о приемлемости величины a .

Учитывая это, в случае МПП свободный член a можно считать приемлемым для решения поставленной задачи, если вносимая им систематическая погрешность не превышает требований соотношения (32), где величины a_{line} и $a_{\Delta A}$ отвечают требованиям (15) и (31). Результаты расчетов величин a по соотношениям (15, 31, 32) представлены в Табл. 3.

Так же, как и в методе стандарта, требования приемлемости (32) применяют только в том случае, когда не выполняется критерий статистической незначимости (30).

9.4. 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). В случае контроля примесей нахождение величин ПО и ПКО является обязательным [9].

В соответствии с ГФУ-ЕФ [1, 9], ПО и ПКО могут быть рассчитаны из стандартного отклонения свободного члена линейной зависимости s_a и ее угла наклона b :

МПП:

$$ПО = 3.3 \times s_a / b. \quad (33)$$

МПП:

$$ПКО = 10 \times s_a / b. \quad (34)$$

10. Изучение стабильности растворов

Проверка стабильности испытуемого раствора и раствора сравнения является одним из элементов изучения робастности методики [9] и должна проводиться перед началом всех других валидационных исследований. Обычно необходимо показать, что растворы являются стабильными не менее 1 часа [9]. Это означает, что вносимая их нестабильностью систематическая погрешность Δ_t должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$, т.е. [9]:

$$\delta_t \leq 0.32 \times \max \Delta_{As}. \quad (35)$$

В случае спектрофотометрического анализа МПП необходимо показать, что изменение в течение 1 часа оптической плотности испытуемого раствора в нормализованных координатах (т.е. изменение величины Y из соотношения (6)) соответствует требованиям (35). Для этого проводят параллельное измерение оптических плотностей растворов через время $t = 0; 15; 30; 45$ и 60 мин, рассчитывают по уравнению (6) величины Y_t , их стандартное отклонение ($RSD_t, \%$) и доверительный интервал $\Delta_t, \%$ (односторонний коэффициент Стьюдента для 4 степеней свободы и вероятности 0.95 равен 2.13 [8]), который должен соответствовать требованиям соотношения (35), т.е.:

$$\Delta_t (\%) = 2.13 \times RSD_t \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} \quad (36)$$

Величина $\max \Delta_{As}$ находится из соотношений (2-3).

11. Прогноз полной неопределенности методики количественного определения

Прогноз полной неопределенности анализа можно проводить обычным способом [9] по со-

отношению (1) с использованием соотношений (10-12, 14, 16) и полагая $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ (см. п. 5). Такой прогноз возможен только для синтетических субстанций и ГЛС, где неопределенность пробоподготовки сводится к неопределенности разбавления, т.е. выполняется соотношение (11).

Следует, однако, отметить, что величина Δ_{ine} априори неизвестна, что затрудняет использование такого подхода. Более корректным является применение соотношения (18), в котором для Δ_{tot} (поскольку оно неизвестно) следует взять предельное значение $\max \Delta_{tot}$, которое берут из Табл. 3, а для Δ_{prec} использовать соотношение:

$$\Delta_{prec}^2 = \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2. \quad (37)$$

Неопределенность градуировки Δ_{SP} рассчитывается обычным способом [12], а для Δ_{FAO} полагают $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ [1, 9]. В этом случае соотношение (18) приобретает вид:

$$\Delta_{As}^2 \leq \max \delta_{tot}^2 + \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2 \leq \max \Delta_{As}^2. \quad (38)$$

Для ЛРС очень значимой является неопределенность $\Delta_{Handler}$, связанная с обработкой пробы (экстракции, выпаривания, химические реакции и т.д.), которую невозможно спрогнозировать в общем случае. Поэтому вопрос о прогнозе неопределенности для ЛРС нуждается в отдельном рассмотрении.

Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа не должна превышать максимально допустимой неопределенности результатов анализа $\max \Delta_{As}$ (Табл. 3).

12. Внутрिलाбораторная прецизионность

Исследование внутрिलाбораторной прецизионности для методик в варианте «метода стандарта» с использованием «подтверждающего» подхода — доверительный интервал нормализованных величин Z (см. соотношение (6)), полученных в разных условиях, не должен превышать максимально допустимой неопределенности методики анализа $\max \Delta_{As}$. Для этого анализируют по методике спецификации $n = 5$ образцов (навесок) одной и той же серии исследуемого препарата в $m = 3$ разных дня. Исследования проводят разные аналитики, на разном оборудовании (спектрофотометры, кюветы, мерная посуда). Все полученные результаты (Z_i) должны принадлежать одной и той же генеральной совокупности. Поэтому для них рассчитывают объединенное среднее значение (Z_{intra}), стандартное отклонение ($SD_{Z-intra}$ %) и относительный доверительный интервал (Δ_{intra} %)

[9]. Величина Δ_{intra} не должна превышать $\max \Delta_{As}$ из уравнений (2-3) и Табл. 3, т.е.:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, (n \times m - 1)] \times SD_{Z-intra} \leq \max \Delta_{As}. \quad (39)$$

Данный подход, хорошо зарекомендовавший себя для ГЛС [9], становится, однако, неопределенным для количественного определения субстанций. Причиной является неопределенность понятия «5 образцов» для субстанции. Это что, разные серии субстанции? Но они могут иметь разное содержание примесей, что может сказываться на результатах количественного определения и не позволяет получить выборку из одной и той же генеральной совокупности. Кроме того, в случае анализа ГЛС разные образцы (модельные смеси) имеют разную концентрацию внутри аналитического диапазона. В случае же субстанций мы проверяем только для одной какой-то точки диапазона, поскольку понятие «модельная смесь» для субстанций отсутствует. Очевидно, что для подтверждения внутрिलाбораторной прецизионности мы должны анализировать разные разбавления одной и той же субстанции в разные дни.

Поэтому целесообразно использовать подход, предложенный для валидации методик анализа профилей растворения [14]. Он состоит в том, что валидационные исследования повторяются в другой день на этом же спектрофотометре. Полученные результаты должны удовлетворять вышерассмотренным критериям линейности, правильности и прецизионности. Кроме того, объединенная выборка из 18 точек должна удовлетворять требованиям к прецизионности (21), т.е.:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, 17] \times SD_{Z-intra} = 1.76 \times SD_{Z-intra} \leq \max \Delta_{prec} = 2.1\%. \quad (40)$$

Преимуществом данного подхода является то, что внутрिलाбораторная прецизионность подтверждается для всего аналитического диапазона на двух независимых экспериментах, а также на объединенной (в два раза более представительной) выборке.

Возникает вопрос, почему исследования внутрिलाбораторной прецизионности следует проводить на одном и том же спектрофотометре? Дело в том, что оптическая плотность на разных спектрофотометрах может различаться на довольно значительную (см. Табл. 1) погрешность калибровки Δ_A . Для рандомизации этой погрешности двух спектрофотометров мало — надо, как минимум, пять. Однако это уже межлабораторный эксперимент (для него в соотношении (40) вместо $\max \Delta_{prec}$ следу-

ет брать $\max \Delta_{As}$). Поэтому для доказательства внутрилабораторной прецизионности данный подход предполагается более оправданным (ведь в одной и той же лаборатории анализ делается на одном и том же спектрофотометре). Отметим, что такой проблемы в методе стандарта нет — из-за отсутствия погрешности калибровки Δ_A .

Следует также отметить, что в связи с обязательностью GMP в Украине, контроль качества субстанций проводится практически исключительно на предприятиях, т.е. в рамках одной лаборатории.

13. Пример: валидация методики количественного определения субстанции методом МПП

13.1. Выбор объекта исследования

Из Табл. 4 видно, что только 2 субстанции (гидрокортизона ацетат и преднизолон) отвечают требованиям Табл. 3 к минимальному значению номинальной оптической плотности $\min A_{ном}$. Для них можно проводить валидацию без коррекции номинальной оптической плотности или допусков содержания. Во всех остальных

случаях систематическая погрешность показателя поглощения $\max \Delta_A$ слишком велика для корректного внешнего анализа методом СФ с помощью МПП.

Учитывая эти данные, в качестве объекта исследования была выбрана субстанция *преднизолон*. Чтобы нивелировать влияние чистоты субстанции, валидационные исследования проводили на фармакопейном стандартном образце (ФСО) ГФУ преднизолон, сертификат № 11/1-2143, с аттестованным значением 99.8 %. Согласно сертификату, данный ФСО предназначен для количественного определения методом одноволновой СФ с $\max \Delta_{As} \geq 1.6$ %, т.е. вполне подходит для количественного определения субстанции *преднизолон* ($\max \Delta_{As} = 3.0$ %).

13.2. Квалификация оборудования [2]

13.2.1. Кюветы

Оценку кюветной разности для пары стандартных кювет (А:В) проводили, измеряя оптическую плотность компенсационного раствора (согласно методике это 96 % спирт Р) с последующим поворотом кювет на 180° и повтор-

Таблица 4

Метрологические характеристики субстанций, описанных в ГФУ, количественное определение которых проводится с помощью МПП

Наименование	Допуски	$\max \Delta_{As}$, %	$A_{ном}$	$\max \Delta_A$, %	$\min A_{ном}$	Σimp , %	$\max \Sigma imp$, %
Бетаметазона дипропионат	97.0-103.0	3.0	0.604	2.3	0.67	2.5	0.96
Гидрокортизона ацетат	97.0-103.0	3.0	0.786	1.8	0.67	1.5	0.96
Преднизолон	97.0-103.0	3.0	0.822	1.7	0.67	2.0	0.96
Преднизолон натрия фосфат	96.0-103.0	3.0	0.574	2.5	0.67	3.0	0.96
Рибофлавин	97.0-103.0	3.0	0.420	3.4	0.67	0.025	0.96
Рифампицин	97.0-102.0	2.0	0.370	3.8	1.00	3.5	0.64
Тестостерона пропионат	97.0-103.0	3.0	0.488	2.9	0.67	1.0	0.96
Хлорамфеникол	98.0-102.0	2.0	0.591	2.4	1.00	0.5	0.64
Хлорамфеникол натрия сукцинат	98.0-102.0	2.0	0.431	3.3	1.00	4.0	0.64
Цианокобаламин	96.0-102.0	2.0	0.455	3.1	1.00	3.0	0.96

Таблица 5

Проверка правильности оптической плотности

Длина волны λ , нм	Оптическая плотность		Удельный показатель поглощения		Отклонение оптической плотности				Неопределенность показателя поглощения, %	
					абсолютное		относительное			
	A^*	$A_{ном}$	$A_{1cm}^{1\%}$	$nom A_{1cm}^{1\%}$	ΔA	ΔA_0	ΔA , %	$\frac{\Delta A}{A_{ном}} \times 100$	δ_A	$\max \delta_A$
235	0.7493	0.747	124.88	124.5	0.0023	0.01	0.31	1.34	0.31	1.9
257	0.8662	0.867	144.37	144.5	0.0008	0.01	0.09	1.15	0.09	1.6
313	0.2918	0.292	48.63	48.6	0.0002	0.01	0.07	3.43	0.07	4.8
350	0.6461	0.646	107.68	107.3	0.0001	0.01	0.02	1.55	0.36	2.2
430	0.9285	0.954	15.90	15.9	0.0255	0.01	2.67	1.05	0.01	1.5

* Среднее из трех измерений значение оптической плотности.

ным измерением. Разница средних значений трех измерений оптических плотностей компенсационного раствора в исходной кювете и повернутой на 180° составила $\Delta A = A_{cp,1} - A_{cp,2} = 0.0949 - 0.0933 = 0.0016$, т.е. соответствует требованию [2]:

$$\delta_{dif} \leq 0.002. \quad (41)$$

13.2.2. *Правильность оптической плотности*

Перед началом эксперимента проводили контроль правильности оптической плотности для данного спектрофотометра (SPECORD-200) по фармакопейному раствору калия дихромата в 0.005 М кислоте серной ($m_{и} = 0.060$ г) в соответствии с методикой ГФУ [1, 2]. Полученные результаты представлены в Табл. 5.

Как видно из Табл. 5, правильность оптической плотности отвечает требованиям ГФУ [1].

13.2.3. *Сходимость оптической плотности с выниманием кювет*

Оценку квалификации спектрофотометра проводили, получая тридцать значений оптической плотности испытуемого раствора субстанции преднизолона против компенсационного раствора с рандомизацией положения кювет. Рассчитанное на основе экспериментальных данных ($A_{cp} = 0.8240$, $SD = 0.0021$) относительное стандартное отклонение оптической плотности $RSD = 0.25$ % соответствует требованиям ГФУ [1, 2]:

$$S_{Ac,r} = 0.25 \leq 0.25 \%. \quad (42)$$

13.2.4. *Предельный уровень рассеянного света*

Рассеянный свет лимитирует ту предельную оптическую плотность, которая может быть достигнута на данном спектрофотометре при данной длине волны. Уровень рассеяния света, в целом, обратно пропорционален четвертой степени длины волны [2], поэтому контроль уровня рассеянного света актуален для ультрафиолетовой области.

Определение уровня рассеянного света проводили в соответствии с требованиями ГФУ-ЕФ [1], при заданных длинах волн с использованием соответствующих растворов. Оптическая плотность трех измерений анализируемого раствора (12 г/л калия хлорида Р) в кювете с толщиной слоя 1 см резко увеличивалась в диапазоне длин волн 220 нм и 200 нм и при 198 нм при использовании воды Р в качестве компенсационного раствора составила $A_{cp} = 2.554$. Полученный результат соответствует требованиям ГФУ ($2.554 > 2.0$) [1].

13.2.5. *Требование к растворителям*

При определении преднизолона в качестве растворителя используется 96 % спирт Р. Оптическая плотность растворителя, измеренная против воздуха при аналитической длине волны $\lambda = 243$ нм, равна $0.1665 \leq 0.2$, т.е. соответствует требованиям ГФУ-ЕФ [1].

13.3. *Валидация методики количественного определения субстанции преднизолона*

13.3.1. *Требования к полной неопределенности результатов анализа (max Δ_{As})*

В соответствии с соотношением (2) и Табл. 4, для преднизолона $max \Delta_{As} = 3.0$ %.

13.3.2. *Прогноз неопределенности пробоподготовки (Δ_{SP}) [12]*

Прогноз неопределенности пробоподготовки Δ_{SP} приведен в Табл. 6.

В соответствии с соотношением (11), должно выполняться требование незначимости величины Δ_{SP} по сравнению с максимально допустимой неопределенностью результатов анализа (Δ_{As}):

$$\Delta_{SP} \leq 0.32 \times max \Delta_{As} = 0.32 \times 3.0 = 0.96 \%.$$

Как видно из Табл. 6, данное требование выполняется.

Таблица 6

Прогноз неопределенности пробоподготовки методик количественного определения субстанции преднизолона

Операция пробоподготовки/субстанция	Параметр расчетной формулы	Неопределенность, %
Испытуемый раствор		
Взятие навески преднизолона	m_0	$0.2 \text{ мг}/100 \text{ мг} \times 100 \% = 0.2 \%$
Доведение до объема в мерной колбе 100 мл	100	0.12 %
Взятие аликвоты пипеткой 2.0 мл	2	0.5 %
Доведение до объема в мерной колбе 100 мл	100	0.12 %
		$\Delta_{SP} = \sqrt{0.2^2 + 0.12^2 + 0.5^2 + 0.12^2} = 0.56 \leq 0.96 \%$

13.3.3. Прогноз полной неопределенности результатов анализа (Δ_{As})

Такой прогноз проводится по соотношению (39). Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа не должна превышать максимально допустимой неопределенности результатов анализа ($\Delta_{As} \leq 3.0\%$). Полную прогнозируемую неопределенность для субстанции преднизолона рассчитывали на основе соотношения (39) и Табл. 3, из которой находим $\max \Delta_{As} = 3.0\%$, $\max \Delta_{tot} = 2.1\%$, а также полагая $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ [1]:

$$\Delta_{As} \leq \sqrt{\max \delta_{tot}^2 + \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \\ = \sqrt{2.1^2 + 0.56^2 + 0.49^2} = 2.2 \leq 3.0\%.$$

Как видно, прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа количественного определения субстанции преднизолона соответствует требованиям ГФУ.

13.3.4. Оценка специфичности

Как уже говорилось выше (п. 3), для количественного определения субстанций методом СФ с помощью МПП доказательство специфичности не требуется. Однако оценка специфичности полезна. Ее можно получить по соотношению (9), из которого следует, что предельно допустимая сумма всех примесей должна быть незначима по сравнению с полной максимальной допустимой неопределенностью

Таблица 7

Результаты исследования стабильности испытуемого раствора

Испытуемый раствор	Время исследования стабильности n_{tr} мин					$C_{r,t}$	$S_{r,t}$	RSD _{tr} %	Δ_{tr} %	$0.32 \times \max \Delta_{As}$ %
	0	15	30	45	60					
A_i	0.8152	0.8209	0.8230	0.8216	0.8218	99.78	0.2558	0.26	0.55	0.96
	0.8191	0.8166	0.8212	0.8223	0.8215					
	0.8171	0.8202	0.8170	0.8230	0.8224					
A_{cp}	0.8171	0.8192	0.8204	0.8223	0.8219					
$Y_i = 100 \times A_i / A_{ном}, \%$ ($A_{ном} = 0.822$ нм)	99.41	99.66	99.81	100.04	99.99					

Таблица 8

Результаты исследования влияния pH среды на поглощение оптической плотности модельными растворами

Испытуемый раствор	Оптическая плотность A_i^* ($\lambda = 243.5$ нм)			$C_{r,pH}$	$S_{r,pH}$	RSD _{pH} %	ΔpH %	$0.32 \times \max \Delta_{As}$ %
	раствор 1: + X кап. 0.01 М HCl	раствор 2: без изменений	раствор 3: + X кап. 0.01 М NaOH					
Испытуемый раствор + 1 кап. реактива								
1	0.8165	0.8152	0.8176	99.59	0.11	0.11	0.33	0.96
2	0.8179	0.8191	0.8204					
3	0.8191	0.8216	0.8210					
A_{cp}	0.8178	0.8186	0.8197					
$Y_i = 100 \times A_i / A_{ном}, \%$ ($A_{ном} = 0.822$ нм)	99.49	99.59	99.72					
Испытуемый раствор + 2 кап. реактива								
1	0.8166	0.8152	0.8194	99.74	0.21	0.21	0.62	0.96
2	0.8197	0.8191	0.8226					
3	0.8209	0.8216	0.8235					
A_{cp}	0.8191	0.8186	0.8218					
$Y_i = 100 \times A_i / A_{ном}, \%$ ($A_{ном} = 0.822$ нм)	99.64	99.59	99.98					
Испытуемый раствор + 3 кап. реактива								
1	0.8187	0.8152	0.8205	99.96	0.33	0.33	0.96	0.96
2	0.8232	0.8191	0.8246					
3	0.8258	0.8216	0.8263					
A_{cp}	0.8226	0.8186	0.8238					
$Y_i = 100 \times A_i / A_{ном}, \%$ ($A_{ном} = 0.822$ нм)	100.07	99.59	100.22					

анализа, т.е. должно выполняться соотношение (см. Табл. 3):

$$\Sigma imp \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.96\%. \quad (43)$$

Из Табл. 4 видно, что для преднизолона $\Sigma imp = 2.0\%$. Как видно, для него требование специфичности не выполняется, т.е. примеси оказывают существенное влияние на анализ методом СФ.

13.3.5. Робастность

Проверку стабильности растворов проводили в течение часа (через каждые 15 мин), определяя оптическую плотность испытуемого раствора в номинальной концентрации согласно методике. Результаты исследования приведены в Табл. 7.

Стабильность оптической плотности испытуемого раствора в течение часа характеризуется доверительным интервалом $\pm 0.55\%$, и незначима по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью анализа $\max \Delta_{As} (0.55 \leq 0.96)$.

Изучение влияния незначительных колебаний рН на оптическую плотность испытуемого раствора проводили, прибавляя по 1 капле 0.01 М раствора хлористоводородной кислоты или 0.01 М раствора гидроксида натрия, чтобы воспроизвести колебания рН $\pm 10\%$. Для полученных модельных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 243.5 нм. Статистические результаты влияния колебаний рН на результат анализа приведены в Табл. 8.

Исследование робастности методики количественного определения преднизолона показало, что колебания рН конечных растворов в диапазоне $\pm 10\%$ значимо не влияет на воспроизводимость величины оптической плотности: $\Delta_{pH} = 0.96 \leq 0.96$.

13.3.6. Линейность

Линейность для исследуемой методики изучали для 9 концентраций модельного раство-

ра, охватывающих диапазон от 80 % до 120 % от номинального содержания в субстанции. Расчеты проводили в системе нормализованных координат. По всем 9 растворам была обчислена методом наименьших квадратов [8] зависимость отношения оптических плотностей $Y_i = (A_i/A_{nom}) \times 100$ от отношения концентраций $X_i = (C_i/C_{nom}) \times 100$, т.е. зависимость:

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

Полученные уравнения линейной зависимости для преднизолона имеют вид:

$$1^{й} \text{ день: } Y_i = 0.9655 \times X_i + 1.3.$$

$$2^{й} \text{ день: } Y_i = 0.9877 \times X_i + 1.2.$$

Метрологические характеристики этих уравнений представлены в Табл. 9.

Пример графического представления данных — см. Рис. 1.

Как видно, требования к линейности для методики количественного определения субстанции преднизолона выдерживаются в два разных дня.

13.3.7. Правильность и прецизионность

Прецизионность и правильность методики оценивали из данных по линейности, полученных в результате анализа одного и того же образца, в разные дни в одной и той же лаборатории на одном и том же приборе. Результаты расчетов прецизионности и правильности представлены в Табл. 10.

13.3.8. Внутрिलाбораторная прецизионность

Расчеты проведены по соотношению (40), результаты представлены в Табл. 10. Как видно, требования внутрिलाбораторной прецизионности выполняются. Корректна в целом и вся методика.

Подводя итоги исследований по валидации методики количественного определения преднизолона методом СФ с помощью МПП, мож-

Таблица 9

Метрологические характеристики линейной зависимости для преднизолона в разные дни. Диапазон — 80-120%, число точек — 9

Величины	Значение		Критерии (для допусков 97-103 %)	Вывод (соответствует или нет)
	1 ^й день	2 ^й день		
<i>b</i>	0.9655	0.9877	—	—
<i>s_b</i>	0.0067	0.0012	—	—
<i>a</i>	1.3	1.2	1) статист. незначимость $\leq 1.89 \cdot s_a = 1.3$; $\leq 1.89 \cdot s_a = 2.3$; 2) приемлемое значение $a \leq 4.39$	Соотв. Соотв. Соотв.
<i>s_a</i>	0.68	1.2	—	—
<i>RSD_o</i>	0.26	0.45	≤ 1.1	Соотв.
<i>r²</i>	0.9996	0.9991	≥ 0.9933	Соотв.

но сделать вывод, что использование МПП для анализа субстанций требует тщательного проведения анализа и учета очень многих факторов, среди которых на первое место выходит квалификация спектрофотометра. Использованию МПП для анализа субстанций способствует обязательность GMP на предприятиях. Благодаря этому, анализ субстанций проводится практически полностью на предприятиях.

Выводы

Разработана метрологически обоснованная стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения в варианте метода показателя поглощения. Методика успешно апробирована

на фармакопейной методике количественного определения субстанции преднизолон. Показана метрологическая некорректность некоторых фармакопейных методик количественного определения в варианте метода показателя поглощения.

ЛИТЕРАТУРА

- 2.2.25. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 36-41. – Додоповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 2008. – С. 50-55.
- Гриздуб А.И. Применение спектрофотометрии в контроле качества лекарственных средств // В кн.: «Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств». Под ред. чл.-кор. НАН

Таблица 10

Результаты анализа модельных смесей в разные дни и их статистическая обработка

№ раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения $X_i = (C_i / C_{ном}) \times 100\%$		Найдено в % к концентрации раствора сравнения $Y_i = (A_i^* / A_{ном}) \times 100\%$		Найдено в % к введенному $Z = (Y_i / X_i) \times 100\%$	
	День 1	День 2	День 1	День 2	День 1	День 2
1	80.32	80.16	78.75	80.31	98.04	100.18
2	85.34	85.17	83.69	85.63	98.06	100.54
3	90.36	90.18	89.10	89.99	98.61	99.79
4	95.38	95.19	93.05	95.14	97.55	99.95
5	100.40	100.20	98.24	100.80	97.85	100.60
6	105.42	105.21	102.94	104.93	97.65	99.74
7	110.44	110.22	107.99	109.61	97.78	99.44
8	115.46	115.23	112.77	115.73	97.67	100.43
9	120.48	120.24	117.72	119.70	97.71	99.55
Среднее, \bar{X} , %					97.9	100.0
Относительное стандартное отклонение, RSD_x , %					0.32	0.43
Относительный доверительный интервал $\Delta_{prec} \% = t(95\%, 8) \times RSD_x = 1.86 \times RSD_x$					0.60	0.80
Критическое значение сходимости результатов $\Delta_{prec} \leq 2.1\%$					Соотв.	Соотв.
Систематическая погрешность $\Delta = X - 100 $					2.1	0.0
Критерий приемлемости систематической погрешности 1) $\Delta \leq \Delta_{prec} / 3 = 0.60 / 3 = 0.20$; $\Delta \leq \Delta_{prec} / 3 = 0.80 / 3 = 0.27$; если не выполняется 1), то 2) $\Delta \leq \max \Delta_{tot} = 2.1$					Не соотв.	Соотв.
Вывод о методике в каждый день:					Соотв.	Соотв.
Внутрилабораторная прецизионность					Корректна	Корректна
Объединенное среднее $Z_{intra} \% =$					99.0	
Объединенное стандартное отклонение $SD_{z-intra} \% =$					1.2	
Относительный доверительный интервал $\Delta_{intra} \% = t(95\%, 17) \times SD_{z-intra} \% = 1.74 \times SD_{z-intra} \% =$					2.0	
Критическое значение сходимости результатов $\Delta_{intra} \leq 2.1\%$					Соотв.	
Внутрилабораторная систематическая погрешность $\Delta =$					1.0	
Критерий приемлемости систематической погрешности 1) $\Delta \leq \Delta_{intra} / \sqrt{18} = 1.2 / 4.2 = 0.27\%$ если не выполняется 1), то 2) $\Delta \leq \max \Delta_{tot} = 2.1\%$					Не соотв.	Соотв.
Внутрилабораторная прецизионность методики					Корректна	
Общий вывод о методике:					Корректна	

* Среднее значение оптической плотности трех измерений

- Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: «НТМТ». — Т. 1. — 2011. — С. 92-202.
3. 2.2.25. Absorption spectrophotometry, ultraviolet and visible / European Pharmacopoeia. 7th edition / European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). — Council of Europe, 67075, Strasbourg Cedex, France, 2009. — P. 40-41.
4. British Pharmacopoeia 2009 CD-ROM.
5. Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И. Особенности фармакопейного подхода к количественному определению фитохимических препаратов // Фармаком. — 2012. — № 3. — С. 7-30.
6. Борщевский Г.И., Гризодуб А.И., Шевина В.Л. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения суммарных препаратов в варианте калибровочного графика // Фармаком. — 2013. — № 3. — С. 24-33.
7. Гризодуб А.И., Левашова О.Л., Борщевский Г.И. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика // Фармаком. — 2011. — № 4. — С. 5-26.
8. 5.3.N. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — С. 187-214.
9. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // В кн.: «Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств». Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: «НТМТ». — Т. 3. — 2011. — С. 934-1063.
10. 2.2.N.2. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — С. 58-67. — Доповнення 1. — 2004. — С. 2-4. — Доповнення 2. — 2008. — С. 85-100. — Доповнення 4. — 2011. — С. 27-28.
11. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — 556 с. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 2008. — 620 с. — Доповнення 3. — 2009. — 280 с. — Доповнення 4. — 2011. — 540 с.
12. Євтифеева О.А. Теоретична оцінка повної невизначеності пробопідготовки при спектрофотометричному визначенні // Укр. журн. клін. та лаб. мед. — 2012. — Т. 7. — № 3. — С. 229-235.
13. Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications/ Sanford Bolton. — 3rd ed. — 737 p.
14. Гризодуб А.И., Борщевская М.И., Коноваленко В.А., Ремез О.С., Борщевский Г.И. Стандартизованная процедура валидации методики количественного определения при исследовании биоэквивалентности *in vitro* // Фармаком. — 2013. — № 4. — С. 36-50.

УДК 615.07

Резюме

Гризодуб О.И., Євтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова О.В. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» Національний фармацевтичний університет

Стандартизована процедура валидації спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів у варіанті методу показника поглинання

Стаття продовжує серію досліджень, присвячених розробці стандартизованих процедур валидації фармакопейних методик контролю якості лікарських засобів.

Розроблена метрологічно обґрунтована стандартизована процедура валидації спектрофотометричних методик кількісного визначення у варіанті методу показника поглинання. Процедура успішно апробована на фармакопейній методиці кількісного визначення субстанції преднізолону. Показана метрологічна некоректність деяких фармакопейних методик кількісного визначення у варіанті методу показника поглинання.

Ключові слова: спектрофотометрія, метод показника поглинання, валидація, кількісне визначення.

UDC 615.07

Summary

Gryzodub O.I., Evtifeeva O.A., Proskurina K.I., Bezumova E.V. State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines», Kharkiv National University of Pharmacy, Kharkiv

Standardized procedure for validation of spectrophotometric assay methods for drugs products by the absorption coefficient method

The article continues the series of investigations on development of standardized procedures for pharmaceutical assays validation. Theoretical consideration is carried out in normalized coordinates proposed earlier. This approach enables to obtain invariant validation criteria. Validation characteristics are received from the linearity study.

Now there are 31 specific monographs (10 specific monographs on substances for pharmaceutical use) in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) that contain spectrophotometric assay using the absorption coefficient method (ACM). So there is a need to develop the standardized validation procedure for the ACM assays.

The paper analyses factors that affect the linearity, accuracy and precision of the ACM assays. It is shown for the ACM assays that the systematic uncertainty is determined by the compendial requirements to the absorbance accuracy of spectrophotometers, depends on the absorbance value and cannot be considered insignificant. It is shown that the considerable part of the ACM assays is metrologically incorrect from this point of view.

In order to take into account the ACM systematic uncertainty during the validation study it is proposed to use the approach that was developed earlier for validation of assays using calibration curves. In accordance with this approach it is proposed to consider that the maximum possible systematic and random uncertainties are equal. It enables to formulate acceptance criteria for the validation characteristics. The critical point for ACM assay validation is qualification of the spectrophotometer for compliance with the compendial requirements prior to measurements.

It is shown that the assay validation of substances for pharmaceutical use by ACM method doesn't need the demonstration of specificity because substance impurities are transparently controlled by a monograph test for related substances. The real compendial monograph ACM assays for the substances for pharmaceutical use as a rule are not specific.

The assay validation of substances for pharmaceutical use by ACM method faces with a problem of an intermediate precision demonstration because the concept of the «model sample» for the substances is indefinite. To solve this problem it is proposed to use the approach developed earlier for validation of an assay intended for a dissolution profile study. According to it, the demonstration of the intermediate precision is realized by repeating the validation study in another day. The validation characteristics must be in compliance with the criteria for both days and for the pooled sample.

The developed standardized validation procedure is successfully applied to validation of the ACM compendial assay of the prednisolone substance.

Keywords: spectrophotometry, specific absorbance method, validation, assay.

Гризодуб Александр Иванович (р. 1948). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Директор ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 2005 г.). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997). Член Международной федерации фармацевтов (2004). Член ученого совета НАН Украины по проблеме «Аналитическая химия» (2004).

Евтифеева Ольга Анатolieвна. Зав. кафедрой аналитической химии НФаУ (2012). Д.фарм.н. (2011), профессор (2013).

Проскурина Ксения Игоревна. Ассистент кафедры аналитической химии НФаУ (2012). К.фарм.н. (2011).

Ганева (ранее Безумова) Елена Васильевна. Преподаватель Николаевского базового медицинского колледжа (2010).

УДК 615.453.07+658.562.4+54.084

Дмитриева М.В., Лукьянова И.С., Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Результаты тестирования по показателю «Растворение» в 10-м раунде Программы профессионального тестирования лабораторий

Представлены результаты тестирования по показателю «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм, полученные участниками 10-го раунда Программы профессионального тестирования лабораторий контроля качества лекарственных средств. Проведена оценка качества результатов участников в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины и принятой аналитической практики. Определено наличие систематической ошибки в результатах участников и проанализированы возможные причины получения неудовлетворительных результатов тестирования. Показано, что основной причиной неудовлетворительных результатов является нарушение фармакопейной процедуры выполнения теста «Растворение», в частности ненадлежащая квалификация оборудования или её отсутствие, невыполнение процедуры дегазации среды растворения или отклонение от фармакопейных требований при её проведении, несоблюдение требований к неопределенности объема среды растворения, нарушение допустимого временного интервала отбора проб и др. Также ряд лабораторий допустили ошибки в интерпретации и представлении результатов тестирования. Результаты проведенной статистической оценки свидетельствуют о неудовлетворительном состоянии контроля качества лекарственных средств по показателю «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм в фармацевтической отрасли и о необходимости проведения корректирующих действий.

Ключевые слова: тест «Растворение», Программа профессионального тестирования, оценка качества результатов, систематическая ошибка.

В 10-й раунд Программы профессионального тестирования лабораторий (ППТ) было включено тестирование по показателю «Тест «Растворение» для твердых дозированных форм». Тестирование по данному показателю уже проводилось в 4-м раунде ППТ. Статистическая оценка результатов участников 4-го раунда показала удовлетворительное состояние отрасли по тесту «Растворение» [1, 2]. Однако выбор тестовых образцов и методики тестирования был недостаточно дискриминирующим, что не позволило в полной мере оценить качество выполнения данного теста в лабораториях отрасли. Кроме того, с 2004 года в Государственной Фармакопее Украины (ГФУ) изменились подходы к оценке приемлемости результатов теста «Растворение», а в тестируемых лабораториях за это время изменилось техническое оснащение и произошла смена персонала. Сочетание перечисленных факторов привело к необходи-

мости включения теста «Растворение» в 10-й раунд ППТ с учетом выводов, полученных из предыдущего опыта проведения тестирования по данному показателю.

При включении тестирования по показателю «Растворение» в 10-й раунд ППТ преследовались следующие цели:

- обеспечение получения достоверных результатов при проведении теста «Растворение» в лабораториях контроля качества лекарственных средств;
- предоставление участникам необходимой информации для выявления проблем и усовершенствования их работы при проведении теста «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм.

Перед участниками тестирования были поставлены следующие задачи:

- провести тест «Растворение» для двух тестовых образцов (ТО) твердых дозирован-

ных форм в соответствии с требованиями общей статьи Европейской Фармакопеи (ЕФ) / ГФУ 2.9.3 [3, 4];

— представить результаты определения путем заполнения формы протокола.

1. Методика испытания. Тестовые образцы

1.1. Методика испытания

Методика теста «Растворение» для таблеток фуросемида включена в монографии на таблетки фуросемида Фармакопеи Британии [5] и Фармакопеи США (Ф. США) [6]. Разработанная методика тестового задания (ТЗ) соответствовала методике показателя «Растворение» монографии Ф. США на таблетки фуросемида и требованиям общей гармонизированной фармакопейной статьи ЕФ / ГФУ «2.9.3. Тест «Растворение» для твердых дозированных форм».

1.2. Тестовые образцы

Исходя из разработанной концепции тестирования, были выбраны и аттестованы два тестовых образца таблеток фуросемида, 40 мг, — ТО 1 и ТО 2. В результате аттестации, проведенной организаторами при подготовке раунда, установлено, что ТО 1 не соответствует требованиям, регламентируемым в методике ТЗ, к количеству действующего вещества, высвобождающегося в раствор за 60 мин ($Q = 80\%$), а ТО 2 соответствует регламентируемым требованиям.

2. Критерии оценивания результатов участников

2.1. В соответствии с общей статьей «2.9.3. Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» [3, 4] оценивание результатов растворения осуществляется согласно критериям приемлемости и может потребоваться проведение тестирования вплоть до 3-й стадии, где в расчет берутся результаты растворения по 24 дозированным единицам. Однако, несмотря на количество результатов растворения дозированных единиц, заключение о результатах испытания всегда только одно — соответствует или не соответствует испытуемый препарат регламентируемым требованиям. Поэтому оценка результатов, полученных участниками при проведении данного определения, осуществлялась следующим образом:

- участники, представившие заключение о результатах растворения ТО 1 и ТО 2, соответствующее заключению, сделанному в результате аттестации этих ТО, считались получившими удовлетворительные результаты тестирования;
- участники, представившие заключение о результатах растворения ТО 1 и ТО 2, не со-

ответствующее заключению, сделанному в результате аттестации этих ТО, считались получившими неудовлетворительные результаты тестирования.

2.2. На основании анализа соблюдения фармакопейных требований к выполнению испытания было оценено качество результатов, полученных участниками тестирования. Результаты, полученные с нарушением фармакопейных требований и требований принятой лабораторной практики, могут быть признаны нелегитимными и оспорены в установленном порядке.

2.3. Организаторами предусмотрено проведение статистической оценки состояния контроля качества ЛС в целом по отрасли по показателю «Тест «Растворение» для твердых дозированных форм». В соответствии с описанным подходом [2], если количество отрицательных результатов участников превышает рассчитанное максимальное количество отрицательных результатов, это свидетельствует о неудовлетворительном состоянии применения данного метода в фармотрасле и о необходимости корректирующих действий.

3. Результаты участников тестирования по показателю «Растворение»

В тестировании по показателю «Растворение» для таблеток фуросемида, 40 мг, приняли участие 38 лабораторий, среди них:

- 18 лабораторий фармацевтических предприятий Украины;
- 5 лабораторий областных территориальных органов Гослекслужбы Украины;
- 7 лабораторий других организаций Украины, которые осуществляют контроль качества лекарственных средств;
- 8 лабораторий контроля качества лекарственных средств из стран ближнего зарубежья.

Заключения о результатах растворения ТО 1 и ТО 2 относительно регламентации в ТЗ, предоставленные участниками тестирования (Участники) и полученные при аттестации ТО (Аттестация), а также выводы о результатах тестирования представлены в Табл. 1.

4. Оценка качества результатов, полученных участниками тестирования, и анализ ошибок

4.1. Результаты тестирования в соответствии с разработанным критерием оценивания

28 из 38 лабораторий, принявших участие в тестировании, представили заключение о качестве ТО 1, не соответствующее заключению, сделанному в результате аттестации ТО. Таким образом, 74 % участников показали не-

удовлетворительные результаты по тесту «Растворение» для ТО 1, а следовательно, и в целом по тестируемому показателю.

4.2. Анализ результатов тестирования

Следует отметить, что для целей контроля качества в соответствии с критериями при-

емлемости результатов, указанными в общей статье 2.9.3, для 1-й стадии неприемлемо рассчитывать среднее значение из 6 таблеток, однако такой расчет был произведен организаторами из первичных данных участников с целью привести полученный массив данных к единому виду и иметь возможность проанали-

Таблица 1

Результаты выполнения теста «Растворение» участниками ППТ

№ п/п	Код	Заключение о соответствии ТО 1 требованиям ТЗ		Заключение о соответствии ТО 2 требованиям ТЗ		Результаты тестирования
		Участники	Аттестация	Участники	Аттестация	
1	19	не соответствует	не соответствует	соответствует	соответствует	удовлетворительные
2	21	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
3	26	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
4	29	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
5	35	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
6	37	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
7	43	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
8	56	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
9	58	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
10	59	не соответствует		соответствует		удовлетворительные
11	4	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
12	3	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
13	12	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
14	15	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
15	17	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
16	20	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
17	22	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
18	23	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
19	25	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
20	28	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
21	30	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
22	31	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
23	32	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
24	33	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
25	34	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
26	36	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
27	38	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
28	42	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
29	44	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
30	46	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
31	47	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
32	50	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
33	53	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
34	54	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
35	55	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
36	60	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
37	61	соответствует		соответствует		не удовлетворительные
38	62	соответствует		соответствует		не удовлетворительные

□ — Заключение о качестве ТО, сделанное участниками, находится в противоречии с результатами, полученными при аттестации ТО.

зировать полученные результаты. Поэтому по результатам, представленным участниками, было посчитано среднее значение высвобождения действующего вещества из ТО 1 и ТО 2 для каждой стадии тестирования (в зависимости от количества проведенных стадий), относительное стандартное отклонение (RSD) этих результатов и доверительный интервал для результатов каждого участника по 1-й стадии [7]. С учетом полученного организаторами при аттестации тестовых образцов значения средней степени растворения для ТО 1 – 66.4 %, для ТО 2 – 85.0 %, было рассчитано отклонение (Δ) среднего значения результатов участников по каждой выполненной стадии для ТО 1 и ТО 2 от соответствующих аттестованных значений. Величины, полученные в результате расчетов, представлены в Табл. 2, 3 и на Рис. 1, 2.

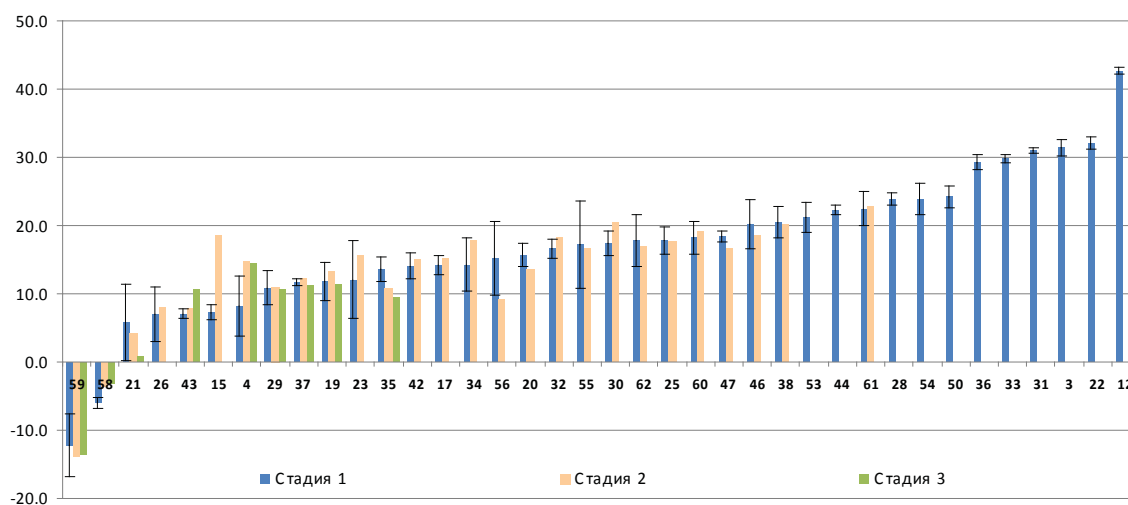
Из представленных материалов видно, что результаты участников, в общем, сдвинуты в большую сторону относительно аттестованного значения степени высвобождения фуросемида из ТО 1 и ТО 2, то есть результаты участников отягощены систематической ошибкой. Причина получения таких результатов может заключаться в том, что на результаты теста «Растворение» оказывает влияние большое количество факторов. Это могут быть факторы, связанные как с процедурой растворения – параметры механической калибровки (вертикальность вала, сосуда; колебания вала; центрирование вала относительно сосуда, вибрация и т. д.), дегазация среды растворения, неопределенность объема среды растворения, положение дозированной единицы на дне сосуда при растворении, время отбора проб, фильтрация и т. д., так и с методикой определения количества действующего

вещества, высвободившегося в раствор. Следует отметить, что большинство перечисленных факторов способны влиять на результаты теста «Растворение» в сторону их увеличения, то есть вносить однонаправленную систематическую ошибку в результаты анализа. Так, несоответствие параметрам механической калибровки (нарушение вертикальности и центрирования вала и сосуда, превышение допустимых значений колебаний вала, вибрации), ненадлежащая дегазация среды растворения, неправильное положение дозированной единицы в сосуде, испарение среды растворения во время испытания, превышение допустимого интервала времени отбора проб, несвоевременное фильтрование пробы, недостаточный объем отбрасываемой пробы при фильтрации через бумажный фильтр – все это приводит к смещению результатов только в сторону увеличения. Кроме того, влияние данных факторов может суммироваться, что приводит к критическому увеличению найденной степени высвобождения. Наличие серьезных проблем у участников тестирования в проведении теста «Растворение» коррелирует с разбросом их результатов. Например, для ТО 1 на 1-й стадии (среднее из 6 результатов) максимальное и минимальное значение участников отличается более чем в 2 раза (54.2 % и 109.1 %).

4.3. Анализ представленных участниками выводов в соответствии с фармакопейными требованиями

Участники тестирования самостоятельно определяли количество стадий тестирования, необходимое для того, чтобы сделать заключение о качестве препарата по показателю «Рас-

Рисунок 1



Отклонения и доверительные интервалы результатов растворения ТО 1

творение» исходя из критериев приемлемости результатов. Результаты не всех лабораторий свидетельствуют о четком понимании логики регламентации по тесту «Растворение». Так, лаборатория под кодом 53 сделала выводы о качестве ТО 1 по первой стадии тестирования, однако степень растворения одной таблетки составляла меньше, чем $Q + 5\%$, и требовалось

продолжение эксперимента. Лаборатория под кодом 4 остановила тестирование, не закончив испытание по 3-й стадии (18 дозированных единиц). Лаборатории под кодом 56 необходимо было продолжить эксперимент по 3-й стадии, так как по результатам 2 предыдущих стадий степень растворения только одной таблетки была ниже 65% ($Q - 15\%$) и нет ни одной таблетки со степенью растворения ниже 55% ($Q - 25\%$).

Таблица 2

Результаты выполнения теста «Растворение» ТО 1

№ п/п	код	1 стадия (6 таблеток)			2 стадия (12 таблеток)			3 стадия (24 таблетки)		
		среднее	Δ	RSD	среднее	Δ	RSD	среднее	Δ	RSD
1	59	54.2	-12.2	11.01	52.6	-13.8	12.21	52.8	-13.6	9.74
2	58	60.4	-6.0	2.16	62.9	-3.5	14.11	63.3	-3.1	11.63
3	21	72.2	5.8	13.72	70.7	4.3	13.19	67.2	0.8	13.89
4	26	73.4	7.0	9.62	74.4	8.0	8.57			
5	43	73.5	7.1	1.88	74.2	7.8	3.49	77.0	10.6	7.20
6	15	73.7	7.3	2.55	85.1	18.7	14.32			
7	4	74.6	8.2	10.46	81.2	14.8	13.27	80.9*	14.5	13.82
8	29	77.3	10.9	6.21	77.4	11.0	7.13	77.0	10.6	8.11
9	37	78.1	11.7	1.29	78.7	12.3	2.34	77.7	11.3	2.60
10	19	78.2	11.8	6.98	79.6	13.2	8.68	77.8	11.4	8.43
11	23	78.5	12.1	13.89	82.0	15.6	11.79			
12	35	80.0	13.6	4.33	77.2	10.8	11.42	75.8	9.4	12.15
13	42	80.5	14.1	4.70	81.5	15.1	4.49			
14	17	80.6	14.2	3.38	81.6	15.2	6.34			
15	34	80.7	14.3	9.48	84.2	17.8	9.40			
16	56	81.6	15.2	13.02	75.6	9.2	13.60			
17	20	82.1	15.7	3.96	80.1	13.7	5.04			
18	32	83.0	16.6	3.23	84.6	18.2	3.40			
19	55	83.6	17.2	15.51	83.1	16.7	12.31			
20	30	83.8	17.4	4.19	86.9	20.5	6.20			
21	62	84.2	17.8	9.39	83.4	17.0	8.99			
22	25	84.2	17.8	4.66	84.1	17.7	4.89			
23	60	84.6	18.2	5.85	85.6	19.2	5.20			
24	47	84.8	18.4	1.72	83.0	16.6	4.67			
25	46	86.6	20.2	8.54	85.0	18.6	6.35			
26	38	86.9	20.5	5.62	86.6	20.2	4.92			
27	53	87.6	21.2	5.38						
28	44	88.7	22.3	1.68						
29	61	88.9	22.5	5.98	89.2	22.8	4.91			
30	28	90.3	23.9	2.18						
31	54	90.3	23.9	5.50						
32	50	90.6	24.2	3.98						
33	36	95.7	29.3	2.76						
34	33	96.2	29.8	1.67						
35	31	97.4	31.0	0.90						
36	3	97.8	31.4	3.10						
37	22	98.5	32.1	2.05						
38	12	109.1	42.7	1.10						

□ — участники, показавшие неудовлетворительный результат тестирования;

* — рассчитано по результатам 18 таблеток.

Для вывода о несоответствии ТО 1 регламентации достаточно было первой стадии (лабораториям под кодами 58 и 59) и второй стадии (лаборатории под кодом 21), т. к. степень растворения больше чем 2 таблеток составляла меньше Q – 15 %. Лаборатория под кодом 50 для ТО 1 и для ТО 2 сделала заключение о соответствии регламентации по 1-й стадии, при этом провела эксперимент и по 2-й стадии.

Таким образом, 7 лабораторий (18 % участников) не смогли правильно определить необходимое количество стадий тестирования.

4.4. Статистическая оценка состояния контроля качества ЛС по показателю «Растворение» в целом по отрасли

Исходя из числа лабораторий, принявших участие в тестировании по показателю «Рас-

Таблица 3

Результаты выполнения теста «Растворение» ТО 2

№ п/п	код	1 стадия (6 таблеток)			2 стадия (12 таблеток)		
		среднее	Δ	RSD	среднее	Δ	RSD
1	26	84.3	-0.8	3.20	85.3	0.3	3.27
2	29	85.2	0.2	3.59	86.5	1.5	4.11
3	56	86.6	1.6	6.92	85.1	0.1	5.92
4	44	87.8	2.8	7.78	89.6	4.6	7.97
5	20	88.2	3.2	2.62			
6	43	89.7	4.7	6.64	87.8	2.8	8.06
7	58	89.8	4.8	6.92	86.7	1.7	7.30
8	25	90.0	5.0	5.03			
9	54	91.2	6.2	4.65			
10	30	91.6	6.6	6.98			
11	32	91.7	6.7	3.69			
12	28	91.8	6.8	4.49			
13	37	92.0	7.0	3.83			
14	60	92.3	7.3	5.34			
15	50	92.5	7.5	3.62			
16	23	93.1	8.1	5.79			
17	59	93.1	8.1	3.09			
18	61	93.3	8.3	4.31			
19	38	93.9	8.9	4.47			
20	34	94.1	9.1	5.54			
21	62	94.6	9.6	5.20			
22	55	95.0	10.0	5.01			
23	47	95.6	10.6	5.42			
24	3	96.2	11.2	2.61			
25	21	96.5	11.5	4.10			
26	46	97.2	12.2	2.33			
27	4	97.4	12.4	3.06			
28	36	97.8	12.8	4.48			
29	53	98.8	13.8	2.89			
30	19	100.2	15.2	1.14			
31	35	100.7	15.7	1.01			
32	42	101.2	16.2	1.45			
33	17	101.5	16.5	1.54			
34	33	101.8	16.8	0.97			
35	22	102.2	17.2	2.69			
36	15	102.3	17.3	2.72			
37	31	103.2	18.2	3.81			
38	12	107.6	22.6	1.65			

■ — участники, показавшие неудовлетворительный результат тестирования.

творение» (38 участников), используя бинаминальное распределение, а также задавая принятым в аналитической практике уровнем брака 5 % и односторонней вероятностью 95 %, можно получить максимальное критическое количество отрицательных результатов для односторонней вероятности 95 %. Для данного количества участников этот критерий составил 5.8. Фактически количество лабораторий, показавших неудовлетворительные результаты в тестировании по показателю «Растворение», составило 28. Таким образом, количество неудовлетворительных результатов участников почти в 5 раз превысило рассчитанное допустимое количество отрицательных результатов. Это свидетельствует о неудовлетворительном состоянии применения данного метода в фармотрасле и необходимости принятия корректирующих действий.

4.5. Оценка качества результатов участников в соответствии с фармакопейными требованиями

Организаторами раунда была разработана форма протокола, позволяющая участникам тестирования продемонстрировать соблюдение фармакопейных требований и требований принятой аналитической практики при выполнении теста «Растворение». Результаты лабораторий, полученные с отклонением от данных требований, считаются недостоверными. Анализ выполнения участниками фармакопейных требований к проведению определения и представлению результатов приведен ниже.

Метрологическая поверка и квалификация оборудования

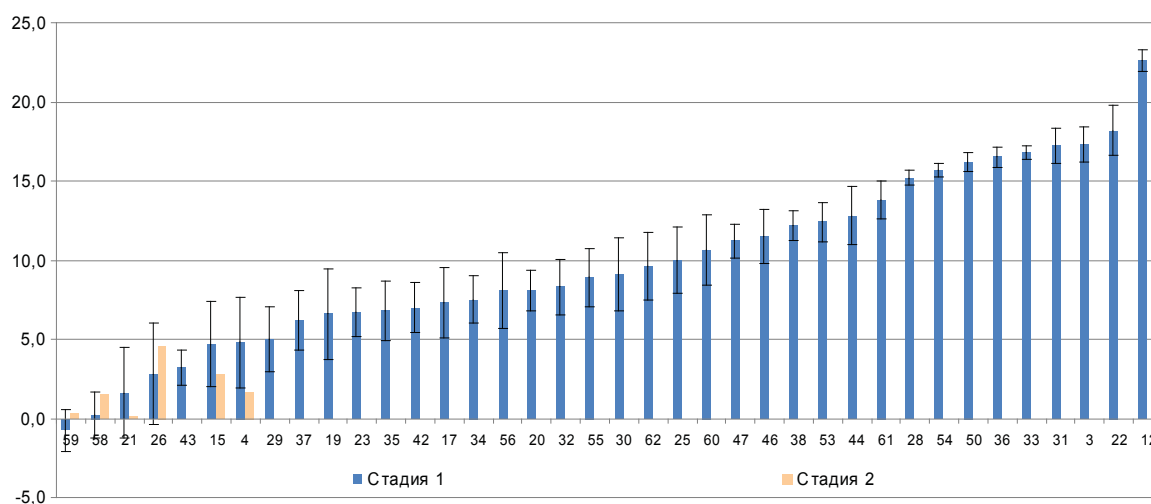
Метрологическую поверку прибора для растворения не проводили лаборатории под кодами 3, 21, 23, 26, 37 и 43 (16 % участников).

Механическую квалификацию прибора для растворения не проводили лаборатории под кодами 3, 25 и 34; лаборатории с кодами 12, 46 и 58 указали, что от даты последней квалификации прошло 1.5 года, а у лаборатории с кодом 53 — 5 лет.

Лаборатории, которые проводили механическую квалификацию, допустили следующие неточности и ошибки. Так, лаборатории с кодами 4, 15, 19, 21, 31, 44, 58, 59 и 60 указали значения параметров механической квалификации (одного или нескольких) только для одной позиции прибора; лаборатория под кодом 22 указала не фактические данные, а требования ГФУ; лаборатория под кодом 17 в качестве параметра квалификации указала только температуру, а лаборатории под кодами 28 и 31 — только частоту вращения. Участник с кодом 54 вместо индивидуальных значений для каждой позиции указал среднее значение температуры в стаканах и среднее значение расстояния ото дна стакана до лопасти; участник 47 измерял температуру бани и указал шесть значений; участник 36 привел результаты скорости вращения только для трех лопастей, а у участника под кодом 44 температура в одном из сосудов не соответствовала фармакопейным требованиям.

Наряду с механической квалификацией 15 лабораторий под кодами 19, 20, 21, 23, 29, 35, 36, 37, 38, 42, 43, 54, 56, 59, 62 проводили верификацию эксплуатационных характеристик оборудования (PVT) с использованием таблеток-калибраторов Ф. США (USP Prednisone). Несмотря на то, что в других фармакопеях нет прямых указаний о проведении данного теста, они не исключают его применение. Проведение PVT-теста — еще один способ убедиться в надлежащей работе

Рисунок 2



Отклонения и доверительные интервалы результатов растворения ТО 2

оборудования. Так, из 10 лабораторий, получивших удовлетворительные результаты, 7 показали соответствие своего оборудования требованиям этого теста. Однако есть некоторые замечания к проведению PVT-теста, которые не влияли на оценку достоверности результатов. Лаборатории с кодами 29, 36 и 62 использовали дополнительно таблетки салициловой кислоты, калибровка по которым не предусмотрена действующим изданием Ф. США. Не указана серия таблеток-калибраторов у лабораторий с кодами 20, 21, 29, 36, 38 и 54, что делает невозможной оценку результатов квалификации, хотя лаборатории с кодами 29 и 54 указали допустимые пределы для среднего значения и коэффициент вариации (CV), а лаборатория под номером 21 указала только CV и требования к нему. Лаборатория с кодом 42 использовала серию таблеток-калибраторов, вышедшую из обращения. Лаборатория под кодом 19 указала номер серии таблеток и вывод о соответствии, но не представила значения среднего результата и коэффициент вариации.

Метрологическую поверку спектрофотометра не проводила лаборатория с кодом 26. Квалификацию прибора не проводили лаборатории под кодами 3, 26, 30, 36 и 58; лаборатория с кодом 15 проводила квалификацию только по одному параметру (уровень рассеянного света), а лаборатория с кодом 12 не указала параметры квалификации. Дату квалификации не указали лаборатории под кодами 15, 37 и 60, а в лабораториях с кодами 44 и 53 квалификация проводилась почти 3 года назад.

Таким образом, результаты 24 лабораторий (63 %) под кодами 3, 4, 12, 15, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 30, 31, 34, 36, 37, 43, 44, 46, 53, 58, 59 и 60 получены с нарушением требований к метрологической поверке и квалификации оборудования.

Соответствие параметров методики растворения фармакопейным требованиям

Дегазация среды растворения

Надлежащая дегазация среды растворения имеет большое значение для получения корректных результатов растворения. Наглядным подтверждением этому является тот факт, что все лаборатории, которые не дегазировали (коды 12, 22, 25, 30) или ненадлежащим образом дегазировали (коды 17, 31, 42, 50) среду растворения, получили неудовлетворительные результаты тестирования.

Неопределенность объема среды растворения

Гармонизованная фармакопейная статья ЕФ / ГФУ 2.9.3 предъявляет требования к неопределенности объема среды растворения ($\pm 1\%$), и разработанная форма протокола для занесения результатов участников содержала этот вопрос. Лаборатории под кодами 15 и 31 не указали, с какой неопределенностью был измерен объем среды растворения, а у лабораторий под кодами 3, 30 и 62 неопределенность объема среды растворения превысила $\pm 1\%$. Перечисленные лаборатории также получили неудовлетворительные результаты тестирования.

Отбор проб

Фармакопейные требования регламентируют допустимый интервал времени отбора проб на уровне $\pm 2\%$ от номинального. Таким образом, приемлемым считалось время отбора проб 58.8-61.2 мин от начала испытания. Лаборатории под кодами 3, 12, 15, 20, 22, 25, 28, 30, 33, 37, 42 и 54 превысили допустимое время отбора проб. Данные, указанные лабораториями под кодами 30, 31, 32, 33, 36, 37, 47, 55, 56, 60 и 62, вызывают сомнения, так как указан большой объем отбираемой пробы за малый промежуток времени.

Лаборатория под кодом 15 указала время отбора проб 120-130 мин (после окончания растворения растворы охлаждали в течение часа, а затем отбирали пробы).

Отбираемый объем: лаборатория под кодом 35 указала, что отбирает 7 мл и отбрасывает 3 мл, однако по методике 5 мл пробы разводятся до 25 мл. Лаборатория под кодом 30 отбирала 20 мл и отбрасывала тоже 20 мл.

Отбрасываемый объем: лаборатория под кодом 43 фильтровала пробу через бумажный фильтр, при этом отбрасываемый объем фильтра указан 2 мл. Этого объема недостаточно, чтобы промыть бумажный фильтр.

Воспроизводимость оптической плотности

Требованиями статьи ГФУ «2.2.25. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» [4] предусмотрена проверка воспроизводимости оптической плотности. Относительное стандартное отклонение оптической плотности для одного раствора, измеренное с выливанием из кюветы, не должно превышать 0.25 %; данное требование не выполнено лабораториями под кодами 3, 15, 19, 25, 30, 31, 33, 36, 38 и 50 (для одного или нескольких растворов).

Представление результатов

При проверке/пересчете данных, предоставленных участниками, были обнаружены следующие несоответствия:

- 3 лаборатории при расчете степени растворения не учли содержание основного вещества в ФСО ГФУ фуросемида;
- 11 лабораторий предоставили результаты расчета RSD, не соответствовавшие результатам, полученным организаторами ППТ при пересчете результатов. Из них 2 лаборатории для расчета RSD использовали не среднее значение степени растворения, а номинальное процентное содержание действующего вещества в таблетке, 1 лаборатория рассчитывала степень растворения каждой дозированной единицы по 2 растворам сравнения и рассчитывала RSD не для усредненного значения степени растворения каждой таблетки, а для всех полученных значений.

В соответствии с регламентацией степени растворения в монографии Фармакопеи США на таблетки фуросемида результаты представляются с точностью до целых. Результаты с такой точностью предоставили 5 лабораторий (13 % участвовавших лабораторий). 13 участников представили результаты с точностью до сотых, что не соответствует фактической точности анализа.

Для предоставления данных по расчету RSD достаточно двух значащих цифр. Такие результаты предоставили 9 лабораторий (24 %).

Одна лаборатория при заполнении формы допустила ошибку, не указав степень растворения для каждой таблетки, а рассчитала среднее значение по усредненной оптической плотности. Это не соответствует фармакопейным требованиям к представлению результатов и не позволяет оценить такие результаты в соответствии с критериями приемлемости.

Таким образом, только 3 лаборатории (8 % участников) под кодами 29, 35 и 61 провели испытание в полном соответствии с фармакопейными требованиями, подтвердив легитимность своих результатов.

Выводы

Оценено качество работы лабораторий по показателю «Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» при проведении межлабораторного тестирования в рамках 10-го раунда ППТ. Из 38 лабораторий, принявших участие в тестировании, 10 (26 % участников) получили положительные результаты и подтвердили свою возможность контролировать

качество лекарственных средств по показателю «Растворение».

Выбраны и аттестованы два тестовых образца таблеток фуросемида по 40 мг, позволяющие провести объективную оценку результатов участников тестирования.

В результате анализа соблюдения фармакопейных требований при проведении теста «Растворение», проведенного на основании разработанной организаторами формы протокола, показано, что результаты только 3 лабораторий (8 % участников) получены в соответствии с требованиями ГФУ к проведению данного испытания.

Проведен анализ и выявлены причины наличия систематической ошибки в результатах участников тестирования. В основном это связано с ненадежной процедурой выполнения теста «Растворение».

Количество неудовлетворительных результатов участников превысило рассчитанное допустимое количество отрицательных результатов, что свидетельствует о неудовлетворительном состоянии проведения теста «Растворение» в фармотрасле и необходимости проведения корректирующих действий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сур С.В., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н. Результаты четвертого раунда программы профессионального тестирования лабораторий в системе государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины. Сообщение 1. Оценка результатов количественного определения, растворения и распадаемости тестовых образцов таблеток парацетамола // Провизор. — 2005. — № 6. — С. 16-21.
2. Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И. Метрологический контроль качества результатов измерений // Фармаком. — 2007. — № 2. — С. 16-25.
3. European Pharmacopoeia. — [7th ed.]. — Strasbourg: Council of Europe, 2011. — 2416 p.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
5. Furosemide Tablets // British Pharmacopoeia. — Vol. 3. — London: HMSO, 2013. — P. 2945.
6. Furosemide Tablets // United States Pharmacopoeia: USP 36. — Rockville, 2013. — P. 3688.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

УДК 615.453.07 + 658.562.4 + 54.084

Резюме

Дмитрієва М.В., Лук'янова І.С.,

Леонтьєв Д.А., Гризодуб О.І.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Результати тестування за показником «Розчинення» у 10-му раунді Програми професійного тестування лабораторій

Наведено результати тестування за показником «Розчинення» для твердих дозованих лікарських форм, що одер-

жані учасниками 10-го раунду Програми професійного тестування лабораторій контролю якості лікарських засобів. Проведено оцінювання якості результатів учасників відповідно до вимог Державної Фармакопеї України та прийнятої аналітичної практики. Визначено наявність систематичної похибки в результатах учасників та проаналізовано вірогідні причини отримання незадовільних результатів. Показано, що основною причиною незадовільних результатів є порушення фармакопейної процедури виконання тесту «Розчинення», зокрема неналежна кваліфікація обладнання або її відсутність, невиконання дегазації середовища розчинення або відхилення від фармакопейних вимог при її проведенні, недотримання вимог до невизначеності об'єму середовища розчинення, порушення допустимого часового інтервалу відбору проб та інше. Також ряд лабораторій припустилися помилок в інтерпретації та представленні результатів тестування. Результати проведеної статистичної оцінки свідчать про незадовільний стан контролю якості лікарських засобів за показником «Розчинення» для твердих дозованих лікарських форм у фармацевтичній галузі та необхідності проведення коригувальних дій.

Ключові слова: тест «Розчинення», Програма професійного тестування, оцінка якості результатів, систематична похибка.

UDC 615.453.07 + 658.562.4 + 54.084

Summary

Dmitriieva M.V., Lukianova I.S.,

Leontiev D.A., Gryzodub O.I.

State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines», Kharkiv

Results of the dissolution test within the 10th round of Professional Testing Scheme for laboratories

The results of the dissolution test for solid dosage forms obtained by the participants of the 10th round of Professional Testing Scheme (PTS) for drug quality control laboratories are presented. Assessment of the results quality was carried out based on the comprehensive analysis of compliance with the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) and standard analytical practice for the dissolution test. Results obtained by a number of participants in violation of these requirements were found illegitimate. It is found that the results of the participants are burdened with a bias and biased in the direction of increasing of the found quantity of dissolved active substance, which led to a large number of unsatisfactory results. The possible reasons for bias in the results of the participants and of unsatisfactory test results are analyzed. It is shown that the main reason is a violation of the pharmacopoeial procedure of the dissolution test, in particular, improper equipment qualification procedure or lack of qualification, not performing the

procedure of dissolution medium degassing or deviation from the pharmacopoeial requirements for its conduction, failure to comply with requirements of the volume of the dissolution medium uncertainty, the violation of the permissible sampling time interval, and others. Also, a number of laboratories made mistakes in the representation and interpretation of the results of testing. The results of the statistical evaluation indicate unsatisfactory state of drug quality control in terms of the dissolution test for solid dosage forms in the pharmaceutical industry and the necessity of corrective actions conducting.

Keywords: dissolution test, professional testing scheme, results quality assessment, bias.

Дмитриєва Марина Васильевна. Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1995). Работает в ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 1995). Ст. научный сотрудник отдела ГФУ, руководитель направления по разработке и внедрению Программы профессионального тестирования. К.фарм.н. (2008).

Лукьянова Ирина Сергеевна. Окончила ХНУ им. В.Н. Каразина (2006). Мл. науч. сотр. отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

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

Гризодуб Александр Иванович (р. 1948). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). 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).

УДК 615.07

Чикалова С.О., Гризодуб А.И.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Оценка влияния результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» на результаты количественного определения методом титрования

Проведена оценка вклада неопределенности результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» в суммарную неопределенность результатов количественного определения субстанций при выполнении анализа методом титрования. На основании полученных результатов определены критерии приемлемости для сходимости результатов испытания «Потеря в массе при высушивании».

Ключевые слова: потеря в массе при высушивании, количественное определение, метод титрования, Государственная Фармакопея Украины, неопределенность, сходимость.

Оценка неопределенности результатов испытаний является мощным инструментом в решении вопросов обеспечения качества результатов испытаний. В публикациях [1, 2] нами были выделены и оценены составляющие неопределенности результатов титрования субстанций при выполнении анализа в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ), а также установлены критерии приемлемости для сходимости результатов при выполнении рутинных испытаний методом титрования. Однако в данных работах нами не был учтен тот факт, что пределы содержания для большинства фармакопейных субстанций указаны в пересчете на сухое или безводное вещество, и неопределенность результатов испытаний «Потеря в массе при высушивании» или «Вода» является составляющей суммарной неопределенности результатов количественного определения.

Результаты оценки неопределенности испытания «Потеря в массе при высушивании», проведенного в соответствии с требованиями ГФУ, представлены нами в публикации [3]. Целью данной работы является оценка влияния неопределенности результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» на результаты количественного определения методом титрования, а также определение критериев приемлемости для сходимости результатов испытания «Потеря в массе при высушивании».

Влияние неопределенности результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» на результаты количественного определения методом титрования

С учетом необходимости пересчета результатов количественного определения на сухое вещество общее выражение для результатов

количественного определения можно записать в виде:

$$X = \frac{X_{\text{проба}}}{(100\% - w)} \times 100\%, \quad (1)$$

где:

$X_{\text{проба}}$ — результаты определения анализируемого вещества в испытуемой пробе, в процентах;

w — результаты испытания «Потеря в массе при высушивании», в процентах.

Суммарную стандартную неопределенность результатов количественного определения в пересчете на сухое вещество рассчитывали по формуле [4]:

$$\frac{u(X)}{X} = \sqrt{\left(\frac{u(X_{\text{проба}})}{X_{\text{проба}}}\right)^2 + \left(\frac{u(w)}{(100 - w)}\right)^2}, \quad (2)$$

где:

$u(X_{\text{проба}})$ — стандартная неопределенность результатов определения анализируемого вещества в испытуемой пробе;

$X_{\text{проба}}$ — концентрация анализируемого вещества в испытуемой пробе;

$\frac{u(w)}{(100 - w)}$ — относительная стандартная неопределенность результатов испытания «Потеря в массе при высушивании»;

w — результат испытания «Потеря в массе при высушивании».

Составляющие неопределенности результатов титрования наиболее часто используемых в фармакопейных методиках количественного определения субстанций методов титрования рассмотрены в публикации [1]. В данной работе выделены и оценены следующие составляющие неопределенности: неопределенность массы навески, неопределенность объема титранта

при титровании пробы, неопределенность концентрации титранта. Критерии незначимости относительной составляющей неопределенности, рассчитанные из соотношения $u(x_i) \leq \frac{s_{\max}}{3}$, рекомендуемого Руководством [4], представлены в Табл. 1.

Стандартная неопределенность результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» оценена нами в 0.070 % (абс.) [3]. Стандартная неопределенность зависит от массы навески и условий высушивания. Указанное значение оценено для массы навески ≈ 1.000 г и может быть сомнительным при температуре высушивания менее 100 °С.

Наиболее часто встречающийся предел нормирования результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» — не более 0.5 %. Значение $(100 - w)$ при $w = 0.5$ % стремится к 100 %, а отношение $\frac{u(w)}{(100 - w)}$ стремится к значению 0.0007. Относительная стандартная неопределенность результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» удовлетворяет условию:

$$\frac{u(w)}{(100 - w)} \leq 0.0007 \quad (3)$$

при значениях $w \leq 6.0$ %. Оцененное значение неопределенности характеризует неопределенность единичного испытания. Сравнивая данное значение с критерием незначимости для неопределенности результатов определения вещества в испытуемой пробе (Табл. 1), можно сделать вывод о его незначимости для всех методов титрования, кроме последних двух, указанных в таблице (методы потенциометрического титрования). Если учесть вклад неопределенности результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» в неопределенность результатов количественного определения методами потенциометрического титрования, то можно увидеть, что суммарная стандартная неопределенность по-прежнему выдерживает критерий приемлемости, выработанный при разработке критериев приемлемости для сходимости при выполнении рутинных испытаний методами титрования [2], – см. Табл. 2.

Таблица 1

Критерии незначимости по отношению к относительной составляющей неопределенности результатов определения анализируемого вещества в испытуемой пробе [1]

Метод титрования	Цена деления бюретки, мл/ характеристики бюретки	Критерий незначимости относительной составляющей неопределенности, $u(x_i) \leq$
Титрование водным титрантом с визуальной фиксацией конечной точки и первичной стандартизацией титранта	0.05 / 25 мл	0.0008
	0.1 / 25 мл	0.0013
Титрование водным титрантом с визуальной фиксацией конечной точки и вторичной стандартизацией титранта	0.05 / 25 мл	0.0011
	0.1 / 25 мл	0.0017
Титрование р-ром хлорной кислоты в уксусной кислоте с визуальной фиксацией конечной точки при корректировке измеренного объема на температуру, стандартизация титранта на бюретке вместимостью 25 мл с ценой деления 0.05 мл	0.02 / 10 мл	0.0007
	0.05 / 10 мл	0.0013
Титрование р-ром хлорной кислоты в уксусной кислоте с визуальной фиксацией конечной точки при корректировке измеренного объема на температуру, стандартизация титранта на бюретке вместимостью 25 мл с ценой деления 0.1 мл	0.02 / 10 мл	0.0012
	0.05 / 10 мл	0.0013
Титрование р-ром хлорной кислоты в уксусной кислоте с визуальной фиксацией конечной точки без корректировки измеренного объема на температуру	0.02 / 10 мл	0.0008
	0.05 / 10 мл	0.0014
Потенциометрическое титрование галогенидов органических оснований 0.1 М р-ром натрия гидроксида по разности объемов между двумя скачками потенциалов	бюретка вместим. 10 мл (ISO 8655-3)	0.0006
Потенциометрическое титрование р-ром хлорной кислоты в уксусной кислоте без корректировки измеренного объема на температуру	бюретка вместим. 10 мл (ISO 8655-3)	0.0006

Таким образом, единичное определение «Потери в массе при высушивании» обеспечивает незначимость влияния неопределенности полученного результата на результаты количественного определения субстанции методом титрования. Однако проведение единичного испытания не рекомендовано, исходя из предположения о возможности грубого промаха, и минимальное количество параллельных испытаний должно быть равно двум.

Критерии приемлемости результатов испытания «Потеря в массе при высушивании»

Максимально допустимое значение стандартного отклонения результатов рутинных испытаний может быть установлено исходя из стандартного отклонения сходимости, полученного в межлабораторном эксперименте, и с использованием критерия Фишера.

Разница между стандартными отклонения является статистически незначимой при условии [5]:

$$\frac{s_1^2}{s_2^2} \leq F(P, v_1, v_2), \text{ при } s_1^2 > s_2^2, \quad (4)$$

где:

$F(P, v_1, v_2)$ — критерий Фишера для заданной степени вероятности P и степеней свободы v_1 и v_2 , с которыми получены значения стандартных отклонений s_1 и s_2 .

Стандартное отклонение сходимости результатов испытания «Потеря в массе при высушивании», полученное в межлабораторном эксперименте с числом степеней 52, составило 0.036 % (абс.) [3]. Критерий Фишера $F(95, 1, 50) = 4.034$.

$$s_{1,2} \leq \sqrt{4.034} \times 0.036 \%, \quad s_{1,2} \leq 0.072 \% \text{ (абс.)}. \quad (15)$$

Стандартное отклонение двух параллельных определений не должно превышать 0.072 %. Умножив данное значение на $\sqrt{2}$, получили максимально допустимую разность для двух параллельных результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» — 0.10 %.

В том случае, если данное требование не выдерживается, проводят третье определение. Критерий Фишера $F(95, 2, 50) = 3.183$.

$$s_{1,3} \leq \sqrt{3.183} \times 0.036 \%, \quad s_{1,3} \leq 0.064 \% \text{ (абс.)}. \quad (16)$$

Стандартное отклонение трех параллельных определений не должно превышать 0.064 %.

Выводы

1. Единичное определение «Потери в массе при высушивании» при выполнении анализа в соответствии с требованиями ГФУ обеспечивает незначимость влияния неопределенности полученного результата на результаты наиболее часто используемых в фармакопейных методиках количественного определения субстанций методов титрования (при условии, что масса навески ≈ 1.000 г).

2. При проведении рутинных испытаний рекомендуется выполнять два параллельных определения «Потери в массе при высушивании». Допустимая разность между двумя полученными значениями составляет 0.10 %.

3. В случае невыполнения требования к разности значений двух параллельных определений проводят третье определение, стандартное отклонение полученных значений не должно превышать 0.064 % (абс.).

4. Данные рекомендации разработаны для испытаний, в которых масса навески ≈ 1.000 г, нормируемое значение потери в массе при вы-

Таблица 2

Сравнение результатов оценки суммарной стандартной неопределенности результатов количественного определения, проведенной с учетом и без учета вклада неопределенности результатов испытания «Потеря в массе при высушивании» (ПМВ)

Метод титрования	Относительная стандартная неопределенность результатов количественного определения, %	
	без учета вклада неопределенности ПМВ [2]	с учетом вклада неопределенности ПМВ
Потенциометрическое титрование галогенидов органич. оснований 0.1 М р-ром натрия гидроксида по разности объемов между двумя скачками потенциалов	0.34	0.35
Потенциометрическое титрование р-ром хлорной кислоты в уксусной к-те без корректировки измеренного объема на температуру	0.33	0.34
Критерий приемлемости, %	$u(X) \leq 0.45$	

сушіння не перевищує 6.0 % і температура висушування речовини не менше 100 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чикалова С.О., Гризодуб А.И. Оцінка неопределенности методик титрування субстанцій з використанням поетапного підходу / Фармаком. — 2011. — № 3. — С. 11-31.
2. Чикалова С.О., Гризодуб А.И. Критерії прийнятності результатів контролю якості субстанцій при використанні методу титрування / Фармаком. — 2012. — № 3. — С. 41-54.
3. Гризодуб А.И., Чикалова С.О. Оцінка неопределенности результатів випробування «Потеря в масі при висушуванні» / Фармація Казахстан. — 2014. — № 2. — С. 41-45.
4. Euracem: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 1995, Laboratory of the Government Chemist, London, UK. ISBN 0-948926-08-2.
5. 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.

УДК 615.07

Резюме

Чикалова С.О., Гризодуб О.І.
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Оцінка впливу результатів випробування «Втрата в масі при висушуванні» на результати кількісного визначення методом титрування

Проведено оцінку внеску невизначеності результатів випробування «Втрата в масі при висушуванні» в сумарну невизначеність результатів кількісного визначення субстанцій при виконанні аналізу методом титрування. На підставі одержаних результатів визначені критерії прийнятності для збіжності результатів випробування «Втрата в масі при висушуванні».

Ключові слова: втрата в масі при висушуванні, кількісне визначення, метод титрування, Державна Фармакопея України, невизначеність, збіжність.

UDC 615.07

Summary

Chikalova S.O., Gryzodub A.I.
State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»

Assessment of influence of loss on drying test results on assay by titration results

An assessment of contribution of the uncertainty of loss on drying test results to the combined uncertainty of assay by titration results under test operation according to the State Pharmacopoeia of Ukraine has been done. According to the results of the assessment and data from interlaboratory experiment acceptability criteria for repeatability of loss on drying test results were set. Single loss on drying test provides nonsignificance of influence of the uncertainty of this test to the results of assay by titration (on conditions that sample weight ≈ 1.000 g, loss on drying is not more than 6.0 %, the drying temperature is not less than 100 °C). It is recommended to do two determinations of loss on drying test in the performance of routine testing. Acceptable difference between two derived values is 0.10 %. If this requirement is not compliant, third determination must be done. Standard deviation of the three determinations must be no more than 0.064 % (absolute). The acceptability criteria have been evaluated by Fisher's test.

Keywords: loss on drying, assay, titration, State Pharmacopoeia of Ukraine, uncertainty, repeatability.

Чикалова Светлана Олеговна. Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1995). Работает в ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 1995). Научный сотрудник отдела ГФУ.

Гризодуб Александр Иванович (р. 1948). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Директор ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» (с 2005). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997).

УДК 615.453.6:615.254.1:541.8:54.062:543.42.062

Аніщенко С.О., Бевз Н.Ю., Георгіянц В.А.
Національний фармацевтичний університет

Верифікація методик кількісного визначення гідрохлортіазиду в таблетках та випробування на розчинення

Робота присвячена верифікації спектрофотометричних методик кількісного визначення та тесту «Розчинення» гідрохлортіазиду в таблетках. Дані методики увійшли до проекту монографії «Гідрохлортіазиду таблетки» Державної Фармакопеї України (ДФУ), розробленої Державним підприємством «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Уведення монографії на таблетки гідрохлортіазиду до плану ДФУ 2-го видання є актуальною задачею, оскільки гідрохлортіазид широко застосовується у медичній практиці як діуретичний та гіпотензивний засіб. Крім того, препарат включений до Примірною переліку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я, Державного формуляра лікарських засобів, номенклатури провідних вітчизняних виробників.

За результатами верифікації встановлено, що методика кількісного визначення гідрохлортіазиду в таблетках відповідає таким валідаційним характеристикам, як правильність, прецизійність і лінійність (Δ_z (%) = $0.60 \leq \max \Delta_z = 2.4$), δ (%) = $0.07 \leq \max \delta = 0.77$, $a = |-2.03| \leq \max a = 3.80$, $r = |0.99993| \geq \min r = |0.99571|$). При проведенні тесту «Розчинення» встановлено, що вимоги до правильності, прецизійності та лінійності виконуються (Δ_z (%) = $1.20 \leq \max \Delta_z = 3.0$, δ (%) = $0.76 \leq \max \delta = 0.96$, $a = |-0.91| \leq \max a = 2.20$, $r = |0.99990| \geq \min r = |0.99864|$).

Ключові слова: верифікація аналітичних методик, абсорбційна спектрофотометрія, таблетки гідрохлортіазиду, тест «Розчинення», кількісне визначення.

Державним підприємством «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» проводиться розробка нових монографій на готові лікарські засоби (ГЛЗ) для включення їх до другого видання Державної Фармакопеї України (ДФУ). Методики контролю якості, що вже валідовані й внесені до провідних Фармакопей, не потребують валідаційних досліджень у повному обсязі. Достатньо провести верифікацію методики, тобто визначення таких валідаційних характеристик, як правильність, прецизійність і лінійність [1-3].

Об'єктом досліджень було обрано таблетки гідрохлортіазиду. Згідно з монографією Британської Фармакопеї (Брит. Ф.) кількісне визначення гідрохлортіазиду в таблетках проводять методом спектрофотометрії в УФ-області у 0.1 М розчині натрію гідроксиду за довжини хвилі 273 нм. Вміст діючої речовини розраховують методом показника поглинання; значення питомого показника поглинання ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) становить 520 [4]. Фармакопея США (Ф. США) рекомендує в тесті «Розчинення» визначення кількості вивільненої діючої речовини проводити із застосуванням методу абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області у 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти за довжини хвилі 272 нм [3].

Згідно зі стандартною процедурою [2, 3] ми провели верифікацію включених до проекту монографії ДФУ методик визначення вмісту гідрохлортіазиду в таблетках і тесту «Розчинення» методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях.

Методи дослідження

Для проведення досліджень використовували таблетки «Гідрохлортіазид-БХФЗ» (ЗАТ

НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) серій 10111, 20411, 30411 і субстанцію гідрохлортіазиду (сертифікат аналізу № 2128, Changzhou Pharmaceutical Factory, Китай) із вмістом діючої речовини 100.5 %, яка відповідає вимогам Європейської Фармакопеї (ЄФ) 6-го видання. Випробування проводили, використовуючи мірний посуд класу А; реактиви, що відповідають вимогам ДФУ; аналітичні ваги Axis, модель ANG 200; спектрофотометр Evolution 60s (США); прилад для визначення розчинення Pharma Test DT-70 (Німеччина).

Методика кількісного визначення гідрохлортіазиду в таблетках

Випробування розчин. До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг гідрохлортіазиду, додають 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, струшують протягом 20 хв, доводять об'єм розчину водою до 100.0 мл, перемішують і фільтрують. 2.0 мл одержаного розчину доводять 0.01 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння. 50 мг стандартного зразка (СЗ) гідрохлортіазиду розчиняють у 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду та доводять об'єм розчину водою до 100.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять 0.01 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 100.0 мл.

Оптичну густину випробуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 273 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, як компенсаційний розчин використовують 0.01 М розчин натрію гідроксиду.

Вміст гідрохлортіазиду в одній таблетці (X), у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \times m_{ct} \times 100 \times 100 \times 2 \times m_{cp} \times \%C3 \times 1000}{A_{ct} \times m_n \times 2 \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{A \times m_{ct} \times m_{cp} \times \%C3 \times 10}{A_{ct} \times m_n},$$

де:

- A — оптична густина випробовуваного розчину;
- A_{ct} — оптична густина розчину порівняння;
- m_{cp} — середня маса таблетки, у міліграмах;
- m_{ct} — маса наважки гідрохлортіазиду для приготування розчину порівняння, у міліграмах;
- m_n — маса наважки порошку таблеток, у міліграмах;
- %C3 — вміст діючої речовини у стандартному зразку, у відсотках.

Тест «Розчинення»

Середовище розчинення: 900 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої.

Обладнання: прилад для визначення розчинення, швидкість обертання 100 об/хв.

Час розчинення: 60 хв.

Випробовуваний розчин. Використовують фільтрат або готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з підходящою концентрацією гідрохлортіазиду, розрахованою відносно номінального вмісту.

Розчин порівняння. Готують розчин порівняння С3 гідрохлортіазиду у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією гідрохлортіазиду, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

Компенсаційний розчин. 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 272 нм відносно компенсаційного розчину.

Нормування: не менше 60 % (Q) від номінального вмісту гідрохлортіазиду.

Результати досліджень та їх обговорення

Кількісне визначення гідрохлортіазиду у таблетках проводили у 0.01 М розчині натрію гідроксиду за довжини хвилі 273 нм методом стандарту. При реєстрації УФ-спектра поглинання 0.001 % розчину гідрохлортіазиду в 0.01 М розчині натрію гідроксиду в області від 250 нм до 350 нм спостерігали два максимуми поглинання за довжин хвиль 273 нм і 323 нм, що відповідає літературним даним [5-9].

Дослідження УФ-спектрів витягів з таблеткових мас різних серій таблеток гідрохлортіазиду свідчить про те, що спектри мають максимуми за тих же довжин хвиль (Рис. 1).

Виходячи з того, що методики кількісного визначення та тесту «Розчинення» проекту монографії ДФУ ґрунтуються на методиках, наведених у Ф. США та Брит. Ф., доцільно було провести верифікацію досліджуваних методик за такими валідаційними характеристиками: лінійність, прецизійність та правильність [2, 3, 10, 11].

Згідно із загальною статтею ДФУ [1] встановили вимоги до повної невизначеності методики (Δ_{As}).

Допуск вмісту діючої речовини у таблетках, у відсотках до номінального складу, становить 7.5 %. За вимогами ДФУ за таких допусків Δ_{As max} становить 2.40 %, Δ_{Sp max} — 0.77 %.

Розраховані нами невизначеність пробопідготовки

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{\sum_i \Delta_{v,i}^2} = \sqrt{0.4^2 + 0.12^2 + 0.5^2 + 0.12^2 + 0.4^2 + 0.12^2 + 0.5^2 + 0.12^2} = 0.94 \%$$

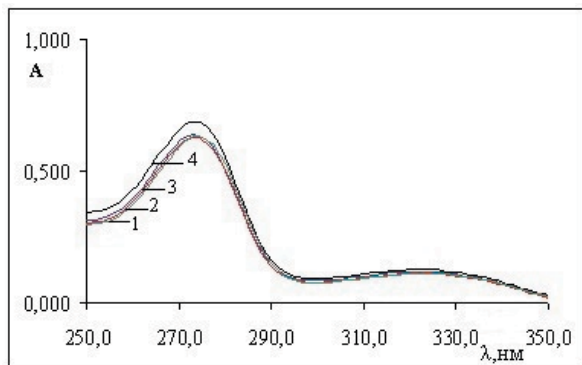
та прогноз повної невизначеності аналізу

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{Sp}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.94^2 + 0.43^2} = 1.03 \%$$

не перевищують максимально допустиму невизначеність методики, і це свідчить про те, що пробопідготовка несуттєво впливає на результат аналізу.

Оцінку впливу компонентів таблеток на оптичну густина проводили, вимірюючи оптичну густина розчину, приготовленого за методикою для модельних зразків без гідрохлортіазиду (A_{blank}), та розчину субстанції гідрохлортіазиду в 0.01 М розчині натрію гідроксиду (A_{subst}), що

Рисунок 1



Спектри поглинання розчину С3 гідрохлортіазиду (3), розчинів з таблеткових мас серій 20411 (2), 10111 (4), 30411 (1) у 0.01 М розчині натрію гідроксиду

за вмістом відповідає кількості гідрохлортіази-ду в 260 мг лікарського засобу.

Систематична похибка склала:

$$\delta_{exc} = \frac{100 \times A_{blank}}{A_{subst}} = \frac{100 \times 0.002}{0.516} = 0.39 \%$$

Фонове поглинання є незначущим і методика характеризується допустимою специфічністю, оскільки отримане значення $0.39 \% \leq 0.77 \%$ (критерії незначущості систематичної похибки).

Нерівність $\delta \leq 0.32 \times \delta_{max}$ не виконується ($0.39 \% > 0.25 \%$), тому перевірку лінійності, прецизійності та правильності проводили з використанням модельних розчинів гідрохлортіази-ду в присутності допоміжних речовин.

Лінійність методики досліджували на 9 модельних розчинах у концентраційному діапазоні 80-120 % від номінального вмісту, крок 5 %. Розрахунок отриманих експериментальних даних проводили методом найменших квадратів

(Табл. 1). Отримані дані наведені у нормалізованих координатах (Рис. 2) і свідчать, що вимоги до лінійності методики виконуються.

Використовуючи підхід одночасного визначення валідаційних характеристик, правильність та прецизійність визначали на тих же модельних розчинах, що і лінійність.

За результатами, наведеними у Табл. 2, зробили висновок, що вимоги до прецизійності та правильності виконуються.

Визначали кількісний вміст гідрохлортіази-ду в таблетках вітчизняного виробника трьох серій, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту в СЗ. Метрологічні характеристики отриманих результатів наведені в Табл. 3 і свідчать про те, що досліджувані таблетки за кількісним вмістом діючої речовини відповідають вимогам ДФУ.

Перед верифікацією тесту «Розчинення» вивчали спектри поглинання розчинів гідрохлорти-

Таблиця 1

Метрологічні характеристики лінійної залежності (кількісне визначення)

Параметр	Результат	Критерії статистичної незначущості	Критерії практичної незначущості	Висновки
b	1.0213			
S _b	0.0042			
a	-2.03	≤ 0.80	≤ 3.80	Виконується за другим критерієм
S _a	0.4209			
S ₀	0.1617			
S ₀ /b	0.16	≤ 1.27		Виконується
S _y	13.6900			
r	0.99993	≥ 0.99571		Виконується

Таблиця 2

Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка (кількісне визначення)

№ розчину	Наважка, г (m _{ст} = 0.0500 г)	X _{ir} , %	A _i (A _{ст} = 0.516)	Y _{ir} , %	Z _{ir} , %
1	0.0400	80.00	0.411	79.65	99.56
2	0.0425	85.00	0.437	84.69	99.64
3	0.0450	90.00	0.465	90.12	100.13
4	0.0475	95.00	0.49	94.96	99.96
5	0.0500	100.00	0.517	100.19	100.19
6	0.0525	105.00	0.543	105.23	100.22
7	0.0550	110.00	0.568	110.08	100.07
8	0.0575	115.00	0.595	115.31	100.27
9	0.0600	120.00	0.623	120.74	100.61
Середнє, \bar{Z} , %					100.07
Відносне стандартне відхилення, RSD _{z1} , %					0.323
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%, 8) \times RSD_z = 1.860 \times S_{z1}$, %					0.60
Критичне значення для розбіжності результатів Δ_{z1} , %					2.4
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $					0.07
Критерії незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z/3 = 0.60/3 = 0.20$; 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0.77$					Виконується

азиду, отриманих через 60 хв після вивільнення діючої речовини з таблеток. Як видно з Рис. 3, в усіх серіях таблеток спостерігаються максимуми поглинання за довжини хвилі 272 нм, які відповідають максимуму поглинання стандартного зразка.

Для дослідження використовували як фільтрат, так і розведення аліквоти. Встановили, що вимоги до лінійності методики виконуються при використанні розведення аліквоти.

Лінійність методики тесту «Розчинення» досліджували на 9 модельних розчинах у концентраційному діапазоні 50-130 % від номіналь-

ного вмісту, крок 10 %. Розрахунок одержаних експериментальних даних проводили методом найменших квадратів (Табл. 4), отримані дані наведені у нормалізованих координатах (Рис. 4) і свідчать, що вимоги до лінійності методики виконуються.

Проведені дослідження тесту «Розчинення» таблеток гідрохлортіазиду свідчать про те, що вимоги до прецизійності та правильності виконуються (Табл. 5).

Результати вивчення валідаційних характеристик спектрофотометричної методики кількіс-

Таблиця 3

Результати визначення кількісного вмісту гідрохлортіазиду в таблетках різних серій та метрологічні характеристики

Серія	\bar{x}	S^2	S	S_x	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\epsilon, \%$	$\bar{\epsilon}, \%$
10111	26.72	0.0142	0.1192	0.0308	0.2099	0.0542	0.79	0.20
20411	24.46	0.0027	0.0520	0.0134	0.0916	0.0237	0.37	0.10
30411	24.76	0.0004	0.0020	0.0008	0.0389	0.0147	0.16	0.06

Таблиця 4

Метрологічні характеристики лінійної залежності (тест «Розчинення»)

Параметр	Результат	Критерій статистичної незначущості	Критерій практичної незначущості	Висновки
b	1.0178			
S_b	0.0050			
a	-0.91	$\leq 0.98 $	$\leq 2.2 $	Виконується
S_a	0.5168			
S_0	0.4275			
S_0/b	0.42	$\leq 1.58 $		Виконується
S_y	30.43			
r	0.99990	$\geq 0.99864 $		Виконується

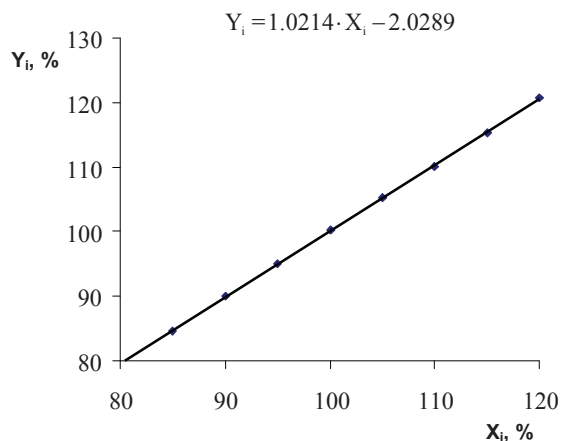
Таблиця 5

Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка (тест «Розчинення»)

№ розчину	$X_{ir}, \%$	$A_i (A_{st} = 0.319)$	$Y_{ir}, \%$	$Z_{ir}, \%$
1	55.56	0.176	55.28	99.49
2	66.67	0.213	66.88	100.31
3	77.78	0.249	78.06	100.36
4	88.89	0.288	90.28	101.57
5	100	0.322	100.94	100.94
6	111.11	0.360	112.75	101.47
7	122.22	0.393	123.20	100.80
8	133.33	0.429	134.38	100.79
9	144.44	0.466	146.08	101.14
Середнє, $\bar{Z}, \%$				100.76
Відносне стандартне відхилення, $RSD_z, \%$				0.64
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%,8) \times RSD_z = 1.860 \times S_{z1}, \%$				1.20
Критичне значення для розбіжності результатів $\Delta_{z1}, \%$				3.0
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $				0.76
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z/3 = 1.20/3 = 0.4$; 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0.96$				Не виконується Виконується

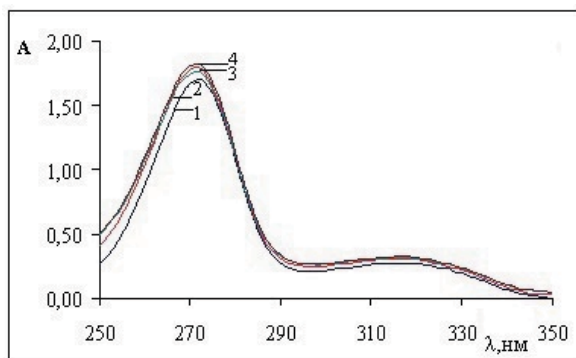
ного визначення і тесту «Розчинення» таблеток гідрохлортіазиду свідчать про те, що запропоновані методики можуть бути застосовані для аналізу даної лікарської форми.

Рисунок 2



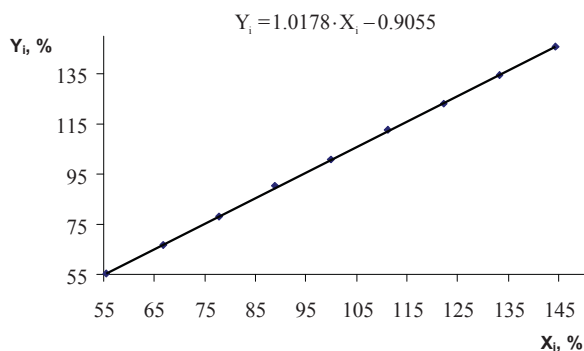
Лінійна залежність оптичної густини від концентрації гідрохлортіазиду в нормалізованих координатах (кількісне визначення)

Рисунок 3



Спектри поглинання розчину С3 гідрохлортіазиду (1), розчинів з таблеткових мас серій 20411 (2), 10111 (3), 30411 (4) у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої

Рисунок 4



Лінійна залежність оптичної густини від концентрації гідрохлортіазиду в нормалізованих координатах (тест «Розчинення»)

Висновки

1. Верифікація методики кількісного визначення гідрохлортіазиду в таблетках методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області показала, що всі валідаційні характеристики (правильність, прецизійність і лінійність) виконуються і методику можна рекомендувати до застосування.

2. При дослідженні тесту «Розчинення» таблеток гідрохлортіазиду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області встановлено, що всі валідаційні параметри (правильність, прецизійність і лінійність) виконуються. Методика є коректною і може бути рекомендована до внесення до монографії ДФУ.

ЛІТЕРАТУРА

- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
- 2.2.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEG, 2001. — С. 58-67. — Доповнення 1. — 2004. — С. 2-4. — Доповнення 2. — 2008. — С. 85-100. — Доповнення 4. — 2011. — С. 27-28.
- Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // В кн.: «Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств». Под ред. В.П. Георгиевского. — Харьков: ООО «НТМТ», — Т. 1. — 2011. — С. 934-1063.
- British Pharmacopoeia [Електронний ресурс] / The British Pharmacopoeia Secretariat. — London, 2007. — CD-ROM.
- USP36 — NF31 [Електронний ресурс].
- Mohammadpour K. Continuous wavelet and derivative transform applied to the overlapping spectra for the quantitative spectrophotometric multi-resolution of triamterene and hydrochlorothiazide in triamterene-h tablets / K. Mohammadpour, M.R. Sohrabi, A. Jourabchi // Talanta. — 2010. — Vol. 2, №4-5. — P. 1821-1825.
- Mohamed Ael-M. Determination of antihypertensive mixtures by use of a chemometrics-assisted spectrophotometric method / Ael-M. Mohamed, H. Salem // Anal. Bioanal. Chem. — 2005. — Vol. 382, № 4. — P. 1066-1072.
- Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data / M.C. Ferraro, P.M. Castellano, T.S. Kaufman // J.Pharm. Biomed Anal. — 2002. — Vol. 7, № 30(4). — P. 1121-1131.
- Spectrophotometric and chemometric determination of hydrochlorothiazide and spironolactone in binary mixture in the presence of their impurities and degradants / M.A. Hegazy, F.H. Metwaly, M. Abdelkawy, N.S. Abdelwahab // Drug Test Anal. — 2010. — Vol. 2, № 5. — P. 243-251.
- Монографії на готові лікарські засоби Госу-дарственной Фармакопеї України / Е.К. Товмасян, А.И. Гризодуб, Н.А. Крупа і др. // Фармаком. — 2010. — № 3. — С. 5-14.
- Монографії на готові лікарські засоби Госу-дарственной Фармакопеї України: історія і стратегія розробки / Е.К. Товмасян, Н.А. Крупа, Т.Н. Матвиєнко і др. // Фармаком. — 2012. — № 1/2. — С. 39-45.

УДК 615.453.6:615.254.1:541.8:54.062:543.42.062

Резюме

Анищенко С.А., Бевз Н.Ю., Георгиянц В.А.
Национальный фармацевтический университет**Верификация методик количественного определения гидрохлортиазида в таблетках и испытания на растворение**

Работа посвящена проведению верификации методик количественного определения и теста «Растворение» гидрохлортиазида в таблетках. Данные методики вошли в проект монографии «Гидрохлортиазиду таблетки» Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ), разработанный Государственным предприятием «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». Введение монографии на таблетки гидрохлортиазида в план ГФУ 2-го издания является актуальной задачей, так как гидрохлортиазид широко применяется в медицинской практике в качестве диуретического и гипотензивного средства. Кроме того, препарат включен в Примерный перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, Государственный формуляр лекарственных средств, номенклатуру ведущих отечественных производителей.

По результатам верификации установлено, что методика количественного определения гидрохлортиазида в таблетках соответствует таким валидационным характеристикам, как правильность, прецизионность и линейность ($\Delta_x (\%) = 0.60 \leq \max \Delta_x = 2.4$, $\delta (\%) = 0.07 \leq \max \delta = 0.77$, $a = |-2.03| \leq \max a = 3.80$, $r = |0.99993| \geq \min r = |0.99571|$). При проведении теста «Растворение» установлено, что требования к правильности, прецизионности и линейности выполняются ($\Delta_x (\%) = 1.20 \leq \max \Delta_x = 3.0$, $\delta (\%) = 0.76 \leq \max \delta = 0.96$, $a = |-0.91| \leq \max a = 2.20$, $r = |0.99990| \geq \min r = |0.99864|$).

Ключевые слова: верификация аналитических методик, абсорбционная спектрофотометрия, таблетки гидрохлортиазида, тест «Растворение», количественное определение.

UDC 615.453.6:615.254.1:541.8:54.062:543.42.062

Summary

Anischenko S. A., Bevez N. Yu., Georgiyants V. A.
National University of Pharmacy**Verification of quantitative determination methods for hydrochlorothiazide tablets and dissolution test**

The paper is devoted to performing verification of methods for quantitative determination and dissolution test of hy-

drochlorothiazide tablets. These methods are included into the monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) developed by the State Pharmacopoeial Centre of Ukraine. Inclusion of the monograph on hydrochlorothiazide tablets into the SPhU, 2nd edition, is relevant because hydrochlorothiazide has found a wide application in medical practice as a diuretic and antihypertensive agent. Besides, this medicine is included to the WHO Model List of Essential Medicines, the State Formulary of medicines, the nomenclature of the leading domestic manufacturers.

According to the results of verification it has been found that the method for quantitative determination of hydrochlorothiazide tablets corresponds to the following validation characteristics: accuracy, precision, linearity ($\Delta_x (\%) = 0.60 \leq \max \Delta_x = 2.4$), $\delta (\%) = 0.07 \leq \max \delta = 0.77$, $a = |-2.03| \leq \max a = 3.80$, $r = |0.99993| \geq \min r = |0.99571|$). When performing the dissolution test it has been determined that requirements to accuracy, precision, linearity are met ($\Delta_x (\%) = 1.20 \leq \max \Delta_x = 3.0$, $\delta (\%) = 0.76 \leq \max \delta = 0.96$, $a = |-0.91| \leq \max a = 2.20$, $r = |0.99990| \geq \min r = |0.99864|$).

Keywords: verification of analytical methods, absorption spectrophotometry, hydrochlorothiazide tablets, dissolution test, assay.

Аніщенко Світлана Олександрівна. Закінчила Харківський державний фармацевтичний інститут (1992). Ст. лаборант кафедри фармацевтичної хімії НФаУ.

Бевз Наталія Юрївна. Закінчила Харківський державний фармацевтичний інститут (1985). К.фарм.н. (1993). Доцент кафедри фармацевтичної хімії НФаУ (1996).

Георгіянци Вікторія Аковівна. Закінчила Харківський державний фармацевтичний інститут (1987). Д.фарм.н. (2005). Професор (2005). Зав. кафедрою фармацевтичної хімії НФаУ (2010).

Технологія лікарських засобів

УДК 615.453.6:615.22+661.12

Сиденко Л.Н., Казаринов Н.А., Гончаров Н.И., Веселова Е.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения»

ПАО «Луганский химико-фармацевтический завод»

Разработка состава и технологии таблеток фозиноприла для лечения артериальной гипертензии

Проведен комплекс экспериментальных исследований по изучению фармако-технологических и физико-химических свойств субстанции фозиноприл натрия. Экспериментально обосновано применение метода влажной грануляции для получения твердой лекарственной формы на основе фозиноприла. Изучено влияние марки и концентрации связующих и других вспомогательных веществ на физико-химические, технологические свойства таблеточных масс и показатели качества таблеток. По результатам исследований разработан состав и предложена рациональная технология получения таблеток. Изучены физико-химические свойства таблеток, стабильность препарата в упаковке из различных материалов в процессе хранения и определены условия и срок хранения.

Ключевые слова: таблетки, фозиноприл, сыпучесть, прессуемость, стабильность, технология, гипотензивное действие.

Разработка отечественных лекарственных препаратов важнейших фармакотерапевтических групп, которые наряду с соответствующей эффективностью являются безопасными и имеют высокий уровень качества, соответствует задачам современной медицины и фармации Украины. Сегодня сердечно-сосудистые заболевания являются актуальной медицинской и социальной проблемой. Среди данной патологии наиболее распространенным заболеванием остается гипертоническая болезнь, поскольку практически каждый четвертый человек в мире имеет повышенный уровень артериального давления [1].

В течение последнего десятилетия ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) заняли центральное место в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Ингибиторы АПФ подавляют активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, являющейся одной из важнейших систем в регуляции артериального давления. Доказано, что избыток ренина и связанных с ним биологически активных веществ, в первую очередь ангиотензина II, приводит не только к артериальной гипертензии, но и к не связанному непосредственно с повышением артериального давления повреждению органов-мишеней, являясь основным фактором прогрессирования артериальной гипертензии и ее осложнений, ремоделирования сердца и сосудов [2, 3].

Результаты многочисленных исследований [4-8] показали, что препараты на основе ингибиторов АПФ являются наиболее эффективными, уменьшающими смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, обладающими ор-

ганопротективными действиями и потому рекомендованы в качестве антигипертензивных средств первого ряда длительного лечения больных артериальной гипертензией.

Среди ингибиторов АПФ, применяемых в качестве антигипертензивных средств, особое место занимает фозиноприл. Этот препарат является пролекарством, после приема внутрь он быстро гидролизует в слизистой оболочке кишечника, а также в печени до фозиноприлата, который и обладает свойствами ингибитора АПФ. Блокада АПФ достигается за счет связывания отрицательно заряженной фосфорной группы препарата с ионом цинка активного центра АПФ и приводит к уменьшению скорости превращения ангиотензина I в ангиотензин II, который является сосудосуживающим соединением. В результате торможения образования ангиотензина II происходит вторичное увеличение активности ренина плазмы за счет устранения отрицательной обратной связи при высвобождении ренина и прямое снижение секреции альдостерона. Уникальными качествами фозиноприла, отличающими его от других ингибиторов АПФ, являются хорошая переносимость, низкая частота побочных эффектов, доказанное кардио-, вазо- и нефропротективное действие [9-11].

В аспекте вышесказанного создание таблеток фозиноприла является актуальным и позволит расширить рынок лекарственных средств отечественного производства за счет эффективного и конкурентоспособного продукта, доступного по цене широким слоям населения Украины.

Целью настоящей работы является фармацевтическая разработка и оптимизация технологических параметров производства таблеток фозиноприла.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были взяты субстанция фозиноприл натрия производства фирмы Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd, Китай, соответствующая требованиям Европейской Фармакопеи 7-го изд. [12], таблеточные массы и таблетки, полученные на их основе.

С целью разработки оптимального состава и технологии твердой лекарственной формы были исследованы следующие вспомогательные вещества:

- разрыхлители: целлюлоза микрокристаллическая (фирма Blanver Farmoquimica LTDA, Бразилия), лактоза моногидрат (фирма Molkerei MEGGLE, Германия), натрия кроскармеллоза (фирма ISP, A.G., Швейцария), кросповидон (фирма ISP, A.G., Швейцария);
- связывающее вещество: поливинилпирролидон марки K-17 (фирма ISP Technologies, Inc, США) и поливинилпирролидон марки K-29/32 (фирма ISP Technologies, Inc, США);
- лубрикант: магния стеарат (фирма FACI, Испания);
- растворители: вода очищенная (ГП «ГНЦЛС»), спирт этиловый (ГП «Укрспирт»).

Фармацевтическая разработка препарата-генерика – таблеток фозиноприла – проводилась на базе референсного препарата «Моноприл®» 10 мг и 20 мг фирмы Bristol-Myers Squibb S.r.l., Италия.

Физико-химические и фармако-технологические свойства фозиноприла натрия, таблеточных масс на его основе и готовой лекарственной формы изучали согласно методик ГФУ [13].

В ходе научно-исследовательских работ проводился качественный и количественный контроль образцов препарата совместно с лабораторией анализа, качества и стандартизации лекарственных препаратов ГП «ГНЦЛС». Качество полученных таблеток оценивали по следующим фармако-технологическим показателям: внешний вид, средняя масса, однородность массы таблеток, однородность дозированных единиц, распадаемость, текучесть, фракционный состав, растворение, прочность к раздавливанию, количественное содержание фозиноприла натрия. Для оценки качества препарата использовали следующие методы: визуальный, гравиметрический, метод жидкост-

ной хроматографии. Количественное содержание фозиноприла натрия, идентификацию и сопутствующие примеси в лекарственной форме при разработке состава, определении оптимальных параметров получения препарата и при хранении определяли методом жидкостной хроматографии согласно ГФУ, 2.2.29, 2.2.46 [13, 14]. Тест «Растворение» в препаратах проводили в соответствии с требованиями ГФУ, 2.9.3 [14], используя прибор с лопастью, методом жидкостной хроматографии (ГФУ, 2.2.29) [13]. Результаты аналитического обеспечения фармацевтической разработки таблеток фозиноприла 10 мг и 20 мг будут представлены в следующих работах.

Фракционный состав таблеточной массы оценивали путем ситового анализа, используя комплект сит с различным диаметром и формой отверстий по методике [13].

Апробация конечных результатов лабораторных исследований проводилась в условиях промышленного производства ПАО «Луганский химико-фармацевтический завод».

Результаты исследований и их обсуждение

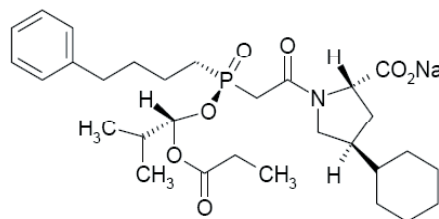
С целью обоснования состава и технологии таблеток на основе фозиноприла натрия в ходе фармацевтической разработки изучены физико-химические, технологические свойства активной субстанции и вспомогательных веществ: фракционный состав, текучесть, пресусеваемость, насыпная плотность, угол естественного откоса.

Субстанция фозиноприл натрия (Рис. 1) представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, который хорошо растворим в воде, не образует агломератов, обусловленных электростатическими силами, умеренно растворим в этаноле, практически нерастворим в гексане.

Результаты изучения фармако-технологических свойств субстанции фозиноприл натрия представлены в Табл. 1.

Из полученных данных (Табл. 1), видно, что субстанция фозиноприл натрия обладает неу-

Рисунок 1



Структурная формула фозиноприла натрия

Таблица 1
**Фармако-технологические свойства субстанции
 фозиноприл натрия (n=5)**

Показатель	Единица измерения	Фозиноприл натрия
Насыпная плотность до усадки m/V_0 после усадки m/V_{1250}	г/мл	0.41±0.01 0.30±0.01
Текучесть	г/с	0.15±0.01
Прессуемость при стандартном давлении прессования 1200 кг/см ²	Н	53±2.0
Угол естественного откоса	градус	59±2.0

довлетворительными объемными характеристиками, неудовлетворительной текучестью, прессуемостью. Следовательно, при разработке состава лекарственной формы в виде таблеток для обеспечения необходимых технологических характеристик массы для таблетирования следует использовать вспомогательные вещества, улучшающие сыпучесть и прессуемость массы.

В качестве базового состава был выбран состав референсного препарата [15, 16]. Для улучшения прессуемости таблеточной массы использована микрокристаллическая целлюлоза, обладающая высокими показателями прессуемости. В качестве формообразователя для прямого прессования нами выбрана лактоза

моногидрат, обладающая высокими показателями текучести. Как связывающее вещество использованы поливинилпирролидон марки К-17 и поливинилпирролидон марки К-29/32. В качестве разрыхлителя использована натрия кроскармеллоза. Скользящий эффект массы для таблетирования обеспечивает магния стеарат.

Одной из экономичных технологий получения таблетированных лекарственных форм является метод прямого прессования. Он позволяет значительно сократить производственный процесс, повысить качество препарата, создать наиболее щадящий технологический режим для активных субстанций. Из литературных данных известно, что фозиноприл натрия может подвергаться гидролизу при воздействии воды и повышенной температуры. Учитывая данный факт, а также то, что дозировка фозиноприла натрия составляет 10 мг или 20 мг (5 % от массы таблетки), мы изучили возможность получения таблеток фозиноприла натрия методом прямого прессования. Состав и фармако-технологические показатели таблеток приведены в Табл. 2.

В результате исследований установлено, что сыпучесть массы неудовлетворительная для таблеточного пресса с рамочным дозатором или дозатором «башмачного» типа, что приводит к неоднородности массы. Полученные таблетки

Таблица 2
Состав и результаты исследования полученных таблеток (n=5)

Состав таблетки		Наименование технологического параметра и/или показателя	Ед. изм.	Результаты
Наименование компонента	%			
Технологические свойства таблеточной массы				
Фозиноприл натрия Лактоза моногидрат Микрокристаллическая целлюлоза Повидон К-17 Натрия кроскармеллоза Магния стеарат Итого:	5.0 78.0	Насыпная плотность до усадки	г/мл	0.51±0.011
		Насыпная плотность после усадки	г/мл	0.69±0.013
		Индекс Карра	%	26.09
	15.0	Текучесть	с/100 г (г/с)	49.0±0.23 (2.0±0.05)
	0.5	Фракционный состав		
	0.5	> 710 мкм	%	9
	1.0	500 мкм	%	22
		180 мкм	%	29
		63 мкм	%	27
	< 45 мкм	%	13	
Фармако-технологические показатели				
		Внешний вид (таблетки белого или почти белого цвета, плоскоцилиндрической формы с фаской и риской)		Соответствует
		Распадаемость (не более 15 мин)	мин	1±0.20
		Прочность (не менее 25 Н)	Н	47±2.40
		Истираемость (не более 1 %)	%	1.38±0.01
		Средняя масса (0.200 г ± 5 %)	г	0.201±0.10

(Табл. 2) не соответствуют требованиям ГФУ к лекарственной форме «Таблетки» по показателям «Истираемость», «Однородность массы». Таким образом, для получения таблеток фозиноприла натрия с указанными вспомогательными веществами невозможно применение метода прямого прессования. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на выбор оптимального связывающего вещества и его концентрации.

Были проведены сравнительные исследования влияния связывающих веществ различных марок на основные технологические свойства гранулята и показатели качества полученных таблеток. Как увлажнитель таблеточной массы использовали: 14 % водный раствор поливинилпирролидона марки К-17, 14 % спиртовой раствор поливинилпирролидона марки К-17, 12 % спиртовой раствор поливинилпирролидона марки К-29/32. Результаты исследований представлены в Табл. 3 и 4.

Как показали результаты исследований (Табл. 3), при использовании в качестве увлаж-

нителя 14 % водного раствора ПВП марки К-17 сыпучесть массы неудовлетворительная для таблеточного пресса с рамочным дозатором или дозатором «башмачного» типа, что приводит к неоднородности массы. Полученные таблетки не соответствуют требованиям ГФУ по показателям «Внешний вид» и «Однородность массы». Из данных, представленных в Табл. 4, видно, что таблетки, полученные при увлажнении 12 % спиртовым раствором ПВП марки К-29/32, не соответствуют требованиям ГФУ по показателю «Распадаемость». Поэтому оптимальным следует считать состав, увлажненный 14 % спиртовым раствором поливинилпирролидона марки К-17. Полученные таблетки имеют достаточную устойчивость к раздавливанию — 97 Н, истираемость не превышает 1 %, распадаемость составляет 7 мин.

Исходя из полученных в ходе работы результатов, рекомендован способ получения препарата по технологии влажной грануляции с использованием увлажнителя 14 % спиртового раствора поливинилпирролидона марки К-17.

Таблица 3

Характеристики полученных гранулятов в зависимости от используемого увлажнителя (n=5)

Наименование исследуемого показателя	Вид и концентрация используемого увлажнителя		
	14 % водный раствор ПВП К-17	12 % спиртовой раствор ПВП К-29/32	14 % спиртовой раствор ПВП К-17
Насыпная плотность до усадки, г/мл	0.62±0.03	0.69±0.03	0.60±0.04
Насыпная плотность после усадки, г/мл	0.73±0.04	0.75±0.05	0.71±0.05
Текучесть, с/100 г (г/с)	34±0.17 (2.9±0.01)	28±0.15 (3.6±0.02)	21±0.13 (4.8±0.03)
Индекс Карра, %	15.07	8.0	15.07
Фракционный состав, %			
> 710 мкм	23	21	18
500 мкм	20	24	22
180 мкм	19	18	27
63 мкм	25	20	23
< 45 мкм	13	17	10

Таблица 4

Фармако-технологические показатели таблеток, полученных с использованием разных увлажнителей (n=5)

Наименование показателя	Вид и концентрация используемого увлажнителя		
	14 % водный раствор ПВП К-17	12 % спиртовой раствор ПВП К-29/32	14 % спиртовой раствор ПВП К-17
Внешний вид (таблетки белого или почти белого цвета, плоскоцилиндрической формы с фаской и риской)	Наблюдаются незначительные «натирсы» по торцу таблетки	Соответствует	Соответствует
Распадаемость (не более 15 мин)	5±0.30	13-17±0.50	7±0.32
Прочность (не менее 25 Н)	82±1.00	125±6.30	97±4.70
Истираемость (не более 1 %)	0.39±0.03	0.68±0.09	0.51±0.07
Средняя масса (0.200 г ± 5 %)	0.201±0.20	0.200±0.20	0.199±0.10

Таблица 5

Результаты изучения стабильности таблеток фозиноприла 10 мг, 20 мг в процессе хранения в различных видах упаковки при t (25±2) °C

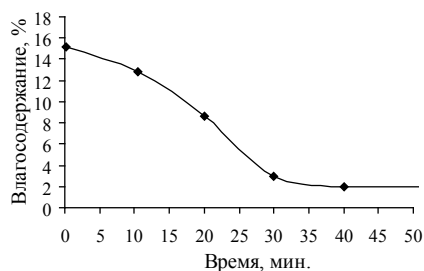
Срок хранения	Хранение при температуре (25±2) °C	
	Пленка поливинилхлоридная и фольга алюминиевая	Контейнер полимерный
1. Описание (таблетки белого или почти белого цвета, плоскоцилиндрической формы с фаской и риской)		
Исходные данные	Соответствует	Соответствует
6 мес.	Соответствует	Соответствует
12 мес.	Соответствует	Соответствует
18 мес.	Соответствует	Соответствует
24 мес.	Соответствует	Соответствует
2. Идентификация (метод жидкостной хроматографии: время удерживания основного пика фозиноприла должно совпадать со временем удерживания этого пика на хроматограмме раствора сравнения)		
Исходные данные	Соответствует	Соответствует
6 мес.	Соответствует	Соответствует
12 мес.	Соответствует	Соответствует
18 мес.	Соответствует	Соответствует
24 мес.	Соответствует	Соответствует
3. Средняя масса, г (от 0.190 до 0.210 (от 0.380 до 0.420)*)		
Исходные данные	0.204 (0.406)*	0.204 (0.406)*
6 мес.	0.200 (0.404)*	0.202 (0.402)*
12 мес.	0.201 (0.402)*	0.200 (0.400)*
18 мес.	0.198 (0.400)*	0.202 (0.398)*
24 мес.	0.201 (0.402)*	0.199 (0.395)*
4. Распадаемость (не более 15 мин, ГФУ 1.2, 2.9.1, тест А)		
Исходные данные	8 (7)*	8 (7)*
6 мес.	8 (8)*	7 (7)*
12 мес.	7 (9)*	7 (8)*
18 мес.	8 (9)*	7 (8)*
24 мес.	8 (9)*	8 (8)*
5. Растворение (препарат должен соответствовать требованиям ГФУ 1.2, 2.9.3, Q = 80 %)		
Исходные данные	99.78 (99.87)*	99.78 (99.87)*
6 мес.	99.78 (99.80)*	99.80 (99.81)*
12 мес.	99.73 (99.77)*	99.76 (99.75)*
18 мес.	99.70 (99.74)*	99.70 (99.72)*
24 мес.	99.65 (99.70)*	99.66 (99.68)*
6. Однородность массы (только две таблетки из 20 могут иметь отклонение от средней массы больше 7.5 %, но не более чем вдвое)		
Исходные данные	Соответствует	Соответствует
6 мес.	Соответствует	Соответствует
12 мес.	Соответствует	Соответствует
18 мес.	Соответствует	Соответствует
24 мес.	Соответствует	Соответствует
7. Количественное содержание фозиноприла натрия, мг (от 9.0 до 11.0 (от 18.0 до 22.0)*)		
Исходные данные	9.87 (20.3)*	9.87 (20.3)*
6 мес.	9.87 (20.1)*	9.87 (20.3)*
12 мес.	9.84 (20.1)*	9.83 (19.9)*
18 мес.	9.85 (19.9)*	9.83 (19.9)*
24 мес.	9.80 (19.7)*	9.79 (19.7)*

Примечание: * — таблетки фозиноприла 20 мг

Нами выбран оптимальный режим сушки гранул при температуре $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$ ввиду чувствительности субстанции к повышенной температуре, что может привести к образованию посторонних примесей.

Для определения времени сушки гранул проведены исследования кинетики этого процесса в сушилке кипящего слоя. Результаты представлены на Рис. 2.

Рисунок 2



Кинетика сушки гранул при температуре $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$

Из данных Рис. 2 видно, что для достижения остаточной влажности 2-3 % полученных гранул необходимо 40 мин.

Таким образом, технологический процесс приготовления таблеток фозиноприла натрия состоит из стадий: просеивание сырья, приготовление увлажнителя, приготовление массы для таблетирования (смешивание и увлажнение компонентов, сушка гранулята, сухое гранулирование, опудривание таблеточной массы), таблетирование, фасовка и упаковка таблеток.

Для изучения стабильности полученный препарат был заложен на хранение при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(60 \pm 5)\%$ [17, 18] в двух видах упаковки: контурная ячейковая упаковка из пленки поливинилхлоридной марки ЕП-73 по ГОСТ 25250-88 и фольги алюминиевой печатной лакированной по ДСТУ ГОСТ 745-2004 и контейнеры полимерные по ТУ 9467-002-20895163-01. Результаты исследований представлены в Табл. 5.

Наблюдения, которые проводились через каждые 6 мес. в течение 2 лет (Табл. 5), показали отсутствие расслоения таблеток, сколов краев, изменения цвета поверхности и отклонений от фармако-технологических параметров, которые заложены в Методах контроля качества (МКК). Содержание сопутствующих примесей не выходило за регламентируемые пределы: примеси А (фозиноприлата) — не более 1.5 %, любой неидентифицированной примеси — не более 0.2 % каждой и сумма любых неидентифицированных примесей — не более 1.5 %. Таким образом, проведенные исследования позволили установить оптимальную технологию получе-

ния таблеток фозиноприла натрия, стабильных как в контурной ячейковой упаковке из пленки поливинилхлоридной марки ЕП-73 и фольги алюминиевой печатной лакированной, так и в контейнерах полимерных.

Выводы

1. Изучение физико-химических и технологических характеристик субстанции фозиноприл натрия, смесей со вспомогательными веществами и готовых таблеток позволило обосновать выбор вспомогательных веществ для таблетированной лекарственной формы антигипертензивного действия фозиноприл 10 мг и 20 мг.

2. Обоснована рациональная технология получения таблетированной массы с использованием метода влажной грануляции, и на основании фармако-технологических исследований гранулированных смесей и готовых таблеток на их основе в качестве увлажнителя был выбран 14 % спиртовой раствор поливинилпирролидона марки К-17.

3. Изучена стабильность таблеток фозиноприла натрия в процессе хранения. Проведенные исследования по установлению срока годности позволяют сделать вывод о физико-химической стабильности препарата в течение 2 лет хранения в контурной ячейковой упаковке и контейнерах полимерных при температуре не выше 25°C .

4. Разработанные таблетки фозиноприла являются эквивалентными референсному препарату «Моноприл®» 10 мг и 20 мг фирмы Bristol-Myers Squibb S.r.L., Италия, по функциональным характеристикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nilsson P.M. Optimizing the pharmacology treatment of hypertension: BP control and target organ protection // Am. J. Cardiovasc. Drugs. – 2006. – Vol. 6, № 5. – P. 287-295.
2. Бобров В.А. Актуальные вопросы лекарственных взаимодействий в клинической практике. Как выбрать оптимальный ингибитор АПФ для больного, принимающего НПВС? / В.А. Бобров, И.В. Давыдова, О.И. Медведенко // Укр. мед. часопис. – 2010. – № 1. – С. 43-48.
3. Сидорова Л.Л. Ингибиторы АПФ: кому и какие? / Л.Л. Сидорова // Укр. мед. вісник. Therapia. – 2007. – № 4 (14). – С. 2-4.
4. Карпов Ю.А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в моно- и комбинированной терапии артериальной гипертензии / Ю.А. Карпов // Русск. мед. журн. – 2009. – Т. 17, № 18. – С. 1122-1126.
5. Теплова Н.В. Клиническая эффективность ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента в лечении артериальной гипертензии / Н.В. Теплова // Русск. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 9. – С. 523-528.
6. Миллер О.Н. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в ремоделировании миокарда у больных артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий / О.Н. Миллер, Т.А. Гусятникова, О.Н. Скурихина // Российский кардиологический журнал. – 2007. – № 5. – С. 74-78.

7. Кутырина И.М. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в профилактике и лечении диабетической нефропатии / И.М. Кутырина // *Consilium medicum*. – 2006. – Т. 8, № 9. – С. 31-35.
8. Куприна А.А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента у пациентов с артериальной гипертензией: принципы выбора препарата / А.А. Куприна, Ю.Б. Белоусов // *Фарматека*. – 2006. – № 13. – С. 52-57.
9. Теплова Н.В. Возможности применения ингибитора АПФ фозиноприла (Фозикард) в кардиологии / Н.В. Теплова, Н.Н. Теплова // *Русск. мед. журн.* – 2007. – Т. 15, № 6. – С. 566-569.
10. Андрущишина Т.Б. Эффективность и переносимость фозиноприла у больных артериальной гипертензией / Т.Б. Андрущишина, Т.Е. Морозова // *Системные гипертензии*. – 2008. – № 1. – С. 16-19.
11. Цветкова О.А. Место фозиноприла в лечении сердечно-сосудистой патологии / О.А. Цветкова // *Русск. мед. журн.* – 2008. – Т. 16, № 5. – С. 285-288.
12. *European Pharmacopoeia*. 7th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2010. – P. 2073.
13. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – 531 с.
14. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
15. *Компендиум 2011 – лекарственные препараты* / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: МОРИОН, 2011. – С. 1726.
16. *Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник*. – М.: АстраФармСервис, 2008. – С. 840.
17. *Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S* / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского и др. – К.: МОРИОН, 2001. – 472 с.
18. *Руководство 42-3.3:2004. Руководство по качеству. Лекарственные средства. Испытания стабильности*. – Киев: МЗ Украины, 2004. – 61 с.

УДК 615.453.6:615.22+661.12

Резюме

Сіденко Л.М., Казарінов М.О., Гончаров М.І., Весселова О.А.
Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»
ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод»

Розробка складу та технології таблеток фозиноприлу для лікування артеріальної гіпертензії

Проведено комплекс експериментальних досліджень із вивчення фармако-технологічних і фізико-хімічних властивостей субстанції фозиноприл натрію. Експериментально обґрунтовано застосування методу вологої грануляції для одержання твердої лікарської форми на основі фозиноприлу. Вивчено вплив марки та концентрації зв'язувальних та інших допоміжних речовин на фізико-хімічні, технологічні властивості таблеткових мас і показники якості таблеток. За результатами досліджень розроблено склад і запропоновано раціональну технологію виготовлення таблеток.

Вивчено фізико-хімічні властивості таблеток, стабільність препарату в упаковці з різних матеріалів у процесі зберігання і визначено умови та термін зберігання.

Ключові слова: таблетки, фозиноприл, плинність, здатність до пресування, стабільність, технологія, гіпотензивна дія.

UDC 615.453.6:615.22+661.12

Summary

Sidenko L.N., Kazarinov N.A., Goncharov N.I., Veselova E.A. State Enterprise «State Scientific Center for Drugs and Medical Products», Kharkiv
Public joint-stock company «Lugansk chemical and pharmaceutical plant», Lugansk

Development of the composition and technology of fosinopril tablets for arterial hypertension treatment

Experimental tests were carried out to study the pharmacotechnological and physico-chemical properties of fosinopril sodium drug substance. It was found that fosinopril sodium drug substance has poor volume characteristics, poor flowability, compressibility. To provide the necessary technical characteristics of tablet mass excipients improving the flowability and compressibility of mass were used: microcrystalline cellulose, lactose monohydrate, croscarmellose sodium, polyvinylpyrrolidone K-17 and K-29/32, magnesium stearate. The influence of grade and concentration of binders and other excipients at the physico-chemical and technological properties of tablet mass and tablets quality indices was studied. Based on the results of studies optimal lubricant was selected — 14 % alcoholic solution of PVP grade K-17. Obtained tablets have adequate crush resistance – 97 N, friability less than 1 %, disintegration not exceeding 7 min. Use of wet granulation method for manufacturing solid dosage form containing fosinopril was experimentally justified. Based on the results, the composition and rational technology of tablets manufacturing were suggested. The physico-chemical properties of the tablets and stability of drug in the package from different materials during the storage were studied. Storage conditions and shelf life were defined.

Keywords: tablets, fosinopril, flowability, compressibility, stability, technology, hypotensive effect.

Сіденко Лариса Николаевна. Ст. научн. сотр. лаборатории пероральных и оральных жидких, твердых лекарственных средств ГП «ГНЦАС» (2008), к.фарм.н. (2008).

Казаринов Николай Александрович. И.о. заведующего лабораторией пероральных и оральных жидких, твердых лекарственных средств ГП «ГНЦАС». Д.фарм.н. (1989). Профессор.

Гончаров Николай Иванович. Инженер 1 категории лаборатории пероральных и оральных жидких, твердых лекарственных средств ГП «ГНЦАС» (2012).

Весселова Елена Андреевна. Начальник производственно-технического отдела ПАО «Луганский химико-фармацевтический завод».

УДК 615.453:615.213:001.891.58

Шакін Є.С., Рибчук В.О., Штейнгатт М.В.
ТОВ «ФармаСтарт»

Дослідження кристалічної структури твердої лікарської форми леветирацетаму

На підставі літературних даних про кристалічні структури леветирацетаму проведено вивчення цієї речовини в комерційних лікарських засобах (ЛЗ). Для розробки технології одержання вітчизняного ЛЗ методом прямого пресування вивчена можливість зміни кристалічної структури при різних способах механічного впливу. Дослідження кристалічної структури проводилося за найбільш характерними точками дифрактограм, для чого було розроблено метод побудови штрих-дифрактограм. Показана можливість зміни структури при механічних впливах і визначена структура субстанції в таблетках, отриманих методом прямого пресування.

Ключові слова: епілепсія, субстанція, рентгеноструктурний аналіз, дифрактограма, кристалічна структура.

Серед захворювань, які характеризуються порушенням функції головного мозку, вагому частину займає епілепсія. Епілепсія відома з давніх часів, етіологію цього захворювання не встановлено. В наші дні захворювання на епілепсію також достатньо поширене, на нього страждає майже 40 мільйонів людей у всьому світі [1, 2, 8].

Головною метою лікування епілепсії є досягнення повного припинення нападів. Однією із сучасних фармакологічних груп, що використовують у лікувальній терапії захворювань на епілепсію, є препарати на основі діючої речовини леветирацетаму. Саме препарати леветирацетаму позиціонуються як препарати першого вибору для більшості форм епілепсій та епілептичних синдромів [3, 14].

Лікарські засоби, які містять леветирацетам, характеризуються своєю ефективністю та безпечністю як при монотерапевтичному лікуванні різних форм епілепсії, так і при допоміжній терапії [12]. Тому завданням сучасних наукових досліджень є вибір субстанції та розробка складу таблеток на основі діючої речовини леветирацетаму з метою досягнення біоеквівалентної лікарської форми з доведеною ефективністю та безпечністю.

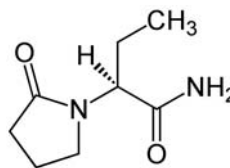
Відомо, що субстанції лікарських засобів, які виготовлені на різних підприємствах, а іноді навіть в межах однієї серії на одному підприємстві, можуть мати різні фізико-хімічні властивості. Це пояснюється специфікою технології одержання активних фармацевтичних інгредієнтів, особливо при виконанні операцій кристалізації, при проведенні очисток від домішок та на фінальних етапах отримання тощо. Як наслідок, відмінності у властивостях субстанцій можуть впливати на процес виробництва лікарських засобів, на властивості готової лікарської форми, наприклад на її стабільність протягом терміну зберігання тощо [4, 5].

Першочерговим завданням досліджень стало вивчення фармако-технологічних властивостей лікарської форми на основі досліджень рентгеноструктурного аналізу порошків активних фармацевтичних інгредієнтів, сумішей діючої речовини та допоміжних речовин, а також сумішей порошків препаратів порівняння (референтних препаратів). Об'єктом досліджень обрано субстанцію леветирацетам виробництва Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd, Китай, та Neuland Laboratories Limited, Індія [15, 16], для якої характерні відмінності у фізико-хімічних властивостях, пов'язані саме з ізомерією.

Вперше леветирацетам був описаний в патенті US 4,837,223, C07D 207/277, UCB SA [BE] (UCB SOCIETE ANONYME), 1989-06-06 [13], де він був визначений таким, що має особливі терапевтичні властивості в порівнянні з відомою рацемічною формою (непатентоване найменування – етирацетам). Як S-енантіомер піролідонного похідного він має в десять разів більш захищену активність проти гіпоксії і в чотири рази більш захищену активність проти церебральної ішемії, ніж рацемічна суміш.

Леветирацетам як діюча речовина був синтезований у процесі досліджень з удосконалення властивостей ноотропілу (діюча речовина — пірацетам), але при подальшому вивченні та наступних клінічних дослідженнях були продемонстровані високі показники протиепілептичної (протисудомної) активності [6, 7].

Структурна формула леветирацетаму:



Емпірична формула: $C_8H_{14}N_2O_2$.

Молекулярна маса: 170.209.

Хімічна назва: (2S)-2-(2-оксопіролідін-1-іл) бутанамід.

Обрана для дослідження субстанція леветирацетаму являє собою білий або майже білий кристалічний порошок зі слабким запахом і гірким смаком, дуже легко розчинна у воді, легко розчинна в хлороформі та метанолі, розчинна в ацетонітрилі, практично нерозчинна в гексані [16].

Мікроскопія субстанції: порошок являє собою ізометричні пластини, як можна бачити на знімку мікроскопії субстанції (Рис. 1).

Патентом US20050143445 (A1), C07D 207/27, 30.06.2005, PARTHASARADHI REDDY B, RATHANAKAR REDDY K [11] визначено три кристалічні форми леветирацетаму. Описано також технологію отримання кристалічної форми «два» із посиланням, що така технологія є найпростішою, а саме – перекристалізація з води при кімнатній температурі.

Рисунок 1



Знімок мікроскопії субстанції леветирацетаму при збільшенні 16×10

Аналіз наведених дифрактограм для трьох форм показує, що для них характерні три основних піки: перший пік — при 14.9°-15.1°, другий — при 18.6°, третій — при 20.6°. У формах «один» і «два», які одержані кристалізацією з органічних розчинників, присутні також три піки, а у формі «три», яка одержується кристалізацією з диметилсульфоксиду та очищенням діізопропіловим ефіром, другий пік незначний.

У закордонних патентах на лікарські засоби на основі леветирацетаму не наводяться результати визначення структури діючої речовини, також не вказано, які за формою кристали субстанції (однотипні чи різні за формами) були обрані як оптимальні для оригінального препарату.

У вітчизняних патентах на винахід UA №97535 [9] та на корисну модель UA №52079 [10] наводяться результати рентгеноструктур-

них досліджень. Встановлено, що є значна різниця в дифрактограмах для субстанції, яка використовувалась у дослідженнях при розробці лікарського засобу, та препарату порівняння, особливо в місцях розташування піків максимальної інтенсивності. Це явище можна пояснити двома причинами: різні кристалографічні структури компонентів складу або вплив технології отримання, які призводять до різниці в розмірах площини в кристалах. Коли різниця в площинах є наслідком першої причини, то має бути розглянуте питання щодо більш поглибленого фармакологічного вивчення продукту. У випадку встановлення наслідку другої причини може виникнути потреба в більш детальному вивченні можливостей подібних змін, тому що виконання технологічної операції таблетування (зміни порошкоподібного стану суміші на таблетований стан) дуже рідко призводить до змін розмірів площин в структурі кристалів.

Тому завданням нашого дослідження було виявлення можливих причин зміни рентгеноструктурних характеристик субстанції леветирацетаму в процесі технологічних операцій при розробці лікарського препарату. З метою одержання лікарського засобу з доведеними властивостями і характеристиками, визначення складу та отримання біоеквівалентної форми науково-дослідні роботи були спрямовані першочергово на рентгеноструктурні дослідження порошоків, композицій порошоків для препарату порівняння та розроблюваного лікарського засобу.

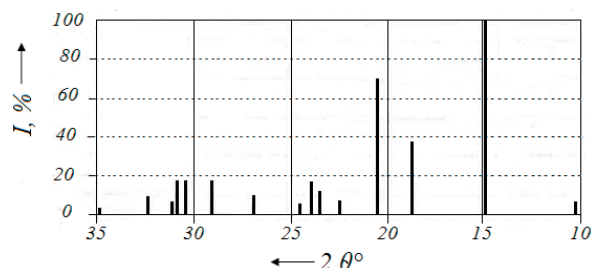
Перш за все обрано умови отримання кристалічної структури при дослідженні дифрактограм різних зразків таблеток і субстанцій:

- дифрактометр ДРОН 3, оснащений сцинтиляційним детектором;
- мідний антикатод $\lambda = 1.5405\text{\AA}$;
- напруга — 40 кВ;
- сила струму — 40 мА;
- розміщення $\theta - \theta$;
- діапазон вимірювань — 5-40°;
- безперервна реєстрація на папері з уточненням положення шляхом точкової реєстрації з часом вимірювання на етапі 10 с;
- приріст перед кожним вимірюванням — 0.020°;
- графітовий монохроматор на відбитому промені.

На Рис. 2-5 наведені штрих-дифрактограми порошку (субстанції), таблеток субстанції леветирацетаму, а також подрібненого порошку (субстанції).

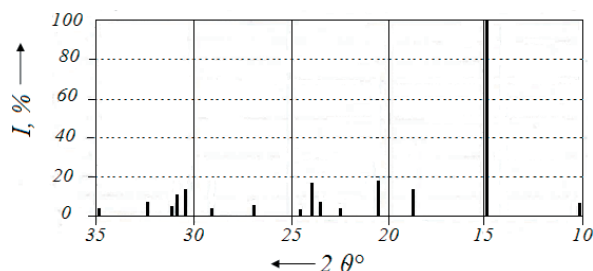
Як видно з наведених дифрактограм, при проведенні технологічних операцій подріб-

Рисунок 2



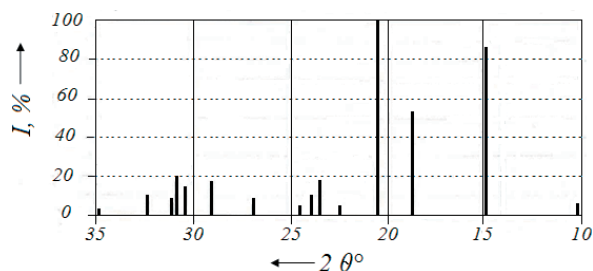
Штрих-дифрактограма попередньо подрібненої субстанції леветирацетаму (зйомка субстанції на підкладці)

Рисунок 3



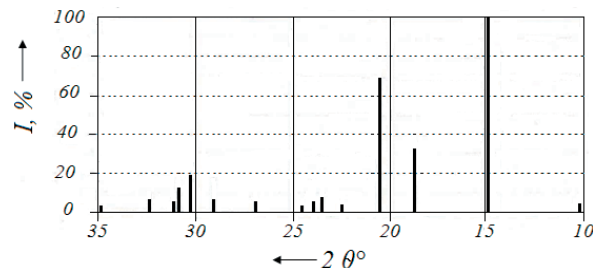
Штрих-дифрактограма неподрібненої субстанції леветирацетаму (зйомка субстанції на підкладці)

Рисунок 4



Штрих-дифрактограма попередньо подрібненої з подальшим пресуванням субстанції леветирацетаму (зйомка субстанції в таблетках, пресування)

Рисунок 5



Штрих-дифрактограма спресованої субстанції леветирацетаму

нення, а також при пресуванні (таблетуванні), що також призводить до подрібнення кристалів, в кристалічній структурі речовини збіль-

шується кількість площин з меншими розмірами граней.

Таким чином, в результаті проведених досліджень була обрана субстанція леветирацетаму з такими фізико-хімічними характеристиками: розподіл частинок методом лазерної дифракції — D(V,0.1) від 50 мкм до 100 мкм; D(V,0.5) від 150 мкм до 250 мкм; D(V,0.9) від 350 мкм до 450 мкм та насипний об'єм до усадки — не менше 0.5 г/мл (який може також застосовуватися як показник розподілу частинок в суміші). Ці фізико-хімічні характеристики були закладені в основу специфікації для діючої речовини.

Дослідження зв'язку структури речовин з технологією отримання та складом лікарської форми буде розглянуто в наступних публікаціях.

Висновки

У межах розробки складу лікарського засобу та технології виготовлення на основі діючої речовини, яка має кристалічну структуру, вважаємо доцільним проведення повного систематичного аналізу кристалографічних характеристик, властивих кожній окремій речовині складу. Проведено дослідження визначення кристалічної структури леветирацетаму за різних умов диспергування. Результати досліджень покладені в основу вибору субстанції для лікарського засобу, розробки специфікації для діючої речовини леветирацетаму, а також вибору композицій допоміжних речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лурія А.Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1962. — С. 269-270.
2. Зенков Л.Р. Непароксизмальные эпилептические расстройства: Руководство для врачей. — М.: МЕДпресс-информ, 2013. — 2-е изд. — С. 15-19.
3. Зенков Л.Р. Кеппра в лечении эпилепсии / Л.Р. Зенков. — М.: Пресс-сервис, 2007. — 47 с.
4. Проблемы биофармации / Под редакцией А.И. Тенцовоной. М.: Медицина. — 1973. — 73 с.
5. Берштейн Дж. Полиморфизм молекулярных кристаллов / Дж. Берштейн; пер. с англ. К.Ю. Суповницкого [и др.]; под ред. М.Ю. Антипина, Т.В. Тимофеевой]; Междунар. союз кристаллографии. — М.: Наука, 2007. — 500 с.
6. Ахапкина В.И. Отличительные особенности оригинально-инновационного состава фенотропила или (RS)-2-(2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)ацетамида, обладающего модуляторной активностью с соразмерным влиянием // Поликлиника. — 2013. — № 4 (3). — С. 43-58.
7. Глоба О.В., Кузенкова Л.М., Баранов А.А. Диагностика и лечение эпилепсии: возможности и трудности // Медицинский совет. — 2010. — № 5-6. — С. 41-46.
8. Сухоносорова О.Ю. Досвід довготривалого нагляду за дітьми, хворими на епілепсію, у Харківській області // Международный неврологический журнал. — 2013. — № 6 (60). — С. 33.
9. Патент 97535 України на винахід, МПК А61К 9/20, А61К 31/4015, А61Р 25/08. Лікарський протиепілептичний препарат леветирацетаму у формі таблеток, спосіб його ви-

готовлення та кристалічний склад / М.В. Штейнгарт, Р.М. Приходько – № а 201002088; заявл. 25.02.2010; опубл. 27.02.2012, Бюл. 4.

10. Патент 52079 України на корисну модель, МПК (2009) А61К 9/20. Лікарський протиепілептичний препарат леветирацетаму у формі таблеток / М.В. Штейнгарт, Р.М. Приходько – № а 201002087; заявл. 25.02.2010; опубл. 10.08.2010, Бюл. 15.

11. Patent Application Publication US 2005/0143445 A1, Int. Cl. A61K 31/4015, C07D 201/12. Novel crystalline forms of levetiracetam / Reddy Bandi Parthasaradhi, Reddy Kura Rathanakar, Reddy Rapolu Raji, Reddy Dasari Muralidhara, Reddy Kesireddy Subash Chander. – Appl. № US 10/451, 940; PCT Filed 18.03.2003; Pub. Date 30.06.2005.

12. Dooley M., Plosker G.L. Levetiracetam. A review of its adjunctive use in the management of partial onset seizures. *Drugs* 2000; 60:4:871 – 893.

13. United States Patent 4,837,223, Int. Cl. C07D 207/277, A61K 31/40. (S)-Alpha-Ethyl-2-Oxo-1-Pyr-Rolidineacetamide compositions / Jean Gobert, Jean-Pierre Geerts, Guy Bodson. – Appl. № 25,277; PCT Filed 12.03.1987; Pub. Date 6.06.1989.

14. *Drugs for Epilepsy. Treatment guidelines. Med Letter* 2008; 6:70:37 – 50.

15. USP 34, P. 3285-3286.

16. European Pharmacopoeia 7.0, P. 2352-2353.

УДК 615.453:615.213:001.891.58

Резюме

Шакин Е.С., Рыбчук В.А., Штейнгарт М.В.

ООО «ФармаСтарт»

Исследования кристаллической структуры твердой лекарственной формы леветирацетама

На основании литературных сведений о кристаллических структурах леветирацетама проведено изучение этого вещества в коммерческих лекарственных средствах (ЛС). Для разработки технологии получения отечественного ЛС методом прямого прессования изучена возможность изменения кристаллической структуры при различных способах механического воздействия. Исследование кристаллической структуры проводилось по наиболее характерным точкам дифрактограмм, для чего был разработан метод построения штрих-дифрактограмм. Показана возможность изменения структуры при механических воздействиях и

определена структура субстанции в таблетках, полученных методом прямого прессования.

Ключевые слова: эпилепсия, субстанция, рентгено-структурный анализ, дифрактограмма, кристаллическая структура.

UDC 615.453:615.213:001.891.58

Summary

Shakin E.S., Rybchuk V.O., Shteingart M.V.

Pharma Start LLC

Crystal structures research of solid dosage forms of levetiracetam

On the basis of literature data on the crystal structures of levetiracetam, this substance was studied in commercial preparations. To develop the manufacturing technology for the production of domestic drug by direct compression method the possibility of changes in the crystal structure at different methods of mechanical action was studied. Based on the X-ray diffraction characteristics, it is determined that there are differences in the diffractograms of the active substance after mechanical impact such as crushing, compression was applied to it. In order to obtain the drug with proven properties, to determine the optimal composition and to create a bioequivalent form research projects have focused on the X-ray characteristics of the substance.

The study of the crystal structure was carried on the most characteristic points of the diffractograms. The method of construction bar – diffractograms was developed for this purpose. The possibility of changing the structure by mechanical effects is shown and the structure of the substance in the tablets obtained by direct compression method was determined.

Key words: epilepsy, substance, X-ray diffraction, X-ray diffractograms, crystal structure.

Шакин Євген Сергійович. Інженер-технолог департаменту розробки та дослідного виробництва ТОВ «ФармаСтарт».

Рибчук Віктор Олександрович. Генеральний директор ТОВ «Капітал».

Штейнгарт Марк Вольфович. Д.фарм.н. (1992). Директор з науки та розвитку ТОВ «ФармаСтарт».

Синтез та вивчення фармакологічної дії

УДК 547.792:615.28.015.11

Саліонов В.О., Панасенко О.І., Книш Є.Г., Камишний О.М., Поліщук Н.М.
Запорізький державний медичний університет

Протимікробна активність іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот

Проведено скринінг протимікробної активності в ряду іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот. Чутливість мікроорганізмів до синтезованих сполук досліджували відповідно до методичних рекомендацій. Під час досліджень готували ряд дворазових серійних розведень препарату в бульйоні Мюллер-Хінтона в об'ємі 1 мл, після чого додавали у кожен пробір по 0.1 мл мікробної завісі (10^6 м.к./мл). Мінімальну інгібуючу концентрацію визначали за відсутністю видимого росту в пробірці з мінімальною концентрацією препарату, мінімальну бактерицидну / фунгіцидну концентрацію (МБЦК, МФЦК) — за відсутністю росту на агарі після висівання з прозорих пробірок. У якості розчинника сполук у дослідженнях використовували диметилсульфоксид, вихідні розчини доводили до концентрації 1 мг/мл. Для первинного скринінгового дослідження сполук були застосовані еталонні тест-культури як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, що належать до різних за морфо-фізіологічними властивостями клінічно значущих груп збудників інфекційних захворювань. Додатково проведено контроль живильних середовищ і розчинника за допомогою загальноприйнятих методик.

Із отриманих даних експерименту встановлена залежність «хімічна структура — біологічна дія» для досліджуваних сполук. Так, найбільший протимікробний ефект виявляє 2-(5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-*N*'-(3-(5-нітрофуран-2-іл)аліліден)ацетогідразид. Виявлена сполука може бути рекомендована до подальших доклінічних досліджень в якості потенційного протимікробного засобу.

Ключові слова: іліденгідразиди, 1,2,4-тріазол, протимікробна активність.

Своєчасне використання ефективних протимікробних препаратів може врятувати людину від загибелі або від неминучої інвалідності. Проте, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, неналежне та неконтрольоване використання цих препаратів призводить до утворення та поширення стійких форм мікроорганізмів [9]. Причина цього — антибактеріальна резистентність — стійкість мікроорганізму до протимікробних препаратів, до яких раніше він був чутливий [1, 10]. Такі мікроорганізми представляють велику загрозу для людини. Таким чином, при безконтрольному прийомі ефективності препаратів знижується або зовсім втрачається. Тому пошук нових антибактеріальних препаратів є доцільним та обґрунтованим.

Після проведення аналізу наукової літератури за останні десятиліття нами було встановлено, що похідні 1,2,4-тріазолу мають величезний та різноманітний спектр фармакологічної дії. На основі цієї нітрогеновмісної гетероциклічної системи в медичній практиці використовуються досить ефективні препарати [3-8]. Так, наприклад, є відомими сучасні протигрибкові препарати «Вориконазол» [11], «Ітраконазол» [12], «Позаконазол» [13], «Тіотриазолін», які мають широкий спектр фармакологічної дії.

Крім того, знайдені дані, що іліденгідразиди 1,2,4-тріазол-3-тіокарбонових кислот широко застосовуються як гербіциди, фунгіциди, регулятори росту рослин та проявляють спазмо-

літичну, антиоксидантну, утеротонічну активності, застосовуються в синтетичній та аналітичній хімії, а також в техніці як ініціатори полімеризації, пластифікатори і стабілізатори полімерів [4].

Також аналіз наукової літератури показав, що протягом 60 років у медичній практиці і ветеринарії для лікування бактеріальних і деяких протозойних інфекцій застосовуються препарати — похідні 5-нітрофурану. Протимікробна активність цього класу хімічних сполук була вперше вивчена в 1944 р. М. Dodd, W. Stillman [14] і одразу привернула велику увагу медиків. Дослідження показали, що серед численних похідних фурану, що вивчалися ще з кінця XVIII століття, протимікробними властивостями характеризуються тільки сполуки, що містять нітрогрупу (NO_2) суворо в 5-му положенні фуранового циклу. Нітрогрупа має істотне значення для прояву антимікробних властивостей ряду хімічних сполук, яке добре демонструється на прикладі нітрофуранів, нітроімідазолів і хлорамфеніколу. Так, нітрофурани досі застосовуються в медичній практиці і на сьогоднішній день практичний інтерес мають «Нітрофурантоїн» («Фурадонін»), «Фуразолідон» і запропонований дещо пізніше «Фуразидин» («Фурагін»).

Тому метою нашого дослідження був скринінг протимікробної активності в ряду нових іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот.

Матеріали та методи

Дослідження протимікробної активності проводилося на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології (відповідальні – зав. кафедрою, д.мед.н., проф. Камишний О.М. і старший викладач, к.мед.н. Поліщук Н.М.).

Чутливість мікроорганізмів до новосинтезованих іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот (Табл. 1) досліджували відповідно до методичних рекомендацій [2]. Під час досліджень готували ряд дворазових серійних розведень препарату в бульйоні Мюллер-Хінтона в об'ємі 1 мл, після чого додавали в кожен пробір по 0.1 мл мікробної завісі (10^6 м.к./мл). Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) визначали за відсутністю видимого росту в пробірці з мінімальною концентрацією препарату, мінімальну бактерицидну / фунгіцидну концентрацію (МБЦК, МФЦК) – за відсутністю росту на агарі після висівання з прозорих пробірок. У якості розчинника сполук в дослідженнях використовували диметилсульфоксид, вихідні розчини доводили до концентрації 1 мг/мл. Для первинного скринінгового дослідження іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот були застосовані еталонні тест-культури як грам-

позитивних, так і грамнегативних бактерій, що належать до різних за морфо-фізіологічними властивостями клінічно значущих груп збудників інфекційних захворювань. У якості набору стандартних тест-штамів взято *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653. Всі тест-штами було отримано у баклабораторії ДУ «Запорізький обласний лабораторний центр держсанепідслужби України». Додатково проведено контроль живильних середовищ і розчинника за допомогою загальноприйнятих методик.

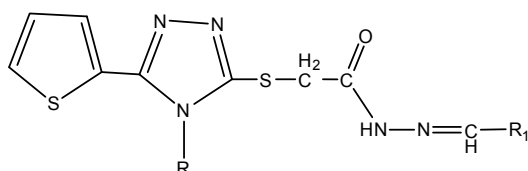
Результати та їх обговорення

Аналізуючи дані протимікробної активності іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот (Табл. 2), можна зробити висновок, що досліджувані сполуки вибірково проявляють свою протимікробну дію.

Введення в молекулу гідразиду 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтової кислоти більшості ароматичних замісників не давало суттєвих результатів протимікробної активності. Слід зауважити, що при введенні у вихідні сполуки фрагмента молекули альдегіду, який містить 5-нітрофуран, відзначалися суттєві результати протимікробної активності.

Таблиця 1

Структурна характеристика іліденгідразидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот



Номер сполуки	R	R ₁
1	H	C ₆ H ₄ ONO ₂ -5
2	H	C ₄ H ₂ ONO ₂ -5
3	CH ₃	C ₆ H ₄ ONO ₂ -5
4	CH ₃	C ₄ H ₂ ONO ₂ -5
5	CH ₃	C ₆ H ₄ NO ₂ -2
6	CH ₃	C ₆ H ₄ OH-4
7	CH ₃	C ₆ H ₄ NO ₂ -3
8	CH ₃	C ₆ H ₄ Cl-4
9	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ ONO ₂ -5
10	C ₂ H ₅	C ₄ H ₂ ONO ₂ -5
11	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ OH-4
12	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ NO ₂ -2
13	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ OH-2
14	C ₂ H ₅	C ₅ H ₄ N
15	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ F-4
16	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ OCH ₃ -4
17	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ (F) ₂ -3,4
18	C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ -Cl-2-F-6

Таблиця 2

Результати протимікробної активності іліденгідрозидів 2-(4-*R*-5-(тіофен-2-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) оцтових кислот

Номер сполуки	Штами, що використовувались під час досліджень	Результат дослідження	
		МІК, мкг/мл	МБцК (МФцК для <i>C. albicans</i>), мкг/мл
1	<i>E. coli</i>	3.9	7.8
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	31.25	125
	<i>C. albicans</i>	15.6	15.6
2	<i>E. coli</i>	3.9	7.8
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	15.6	125
	<i>C. albicans</i>	31.25	31.25
3	<i>E. coli</i>	3.9	7.8
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	31.25	250
	<i>C. albicans</i>	15.6	15.6
4	<i>E. coli</i>	3.9	7.8
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	31.25	125
	<i>C. albicans</i>	31.25	62.5
5	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	125	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
6	<i>E. coli</i>	125	125
	<i>S. aureus</i>	31.25	125
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	250
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
7	<i>E. coli</i>	62.5	125
	<i>S. aureus</i>	62.5	125
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
8	<i>E. coli</i>	62.5	125
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	31.25	62.5
9	<i>E. coli</i>	7.8	15.6
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	250
	<i>C. albicans</i>	31.25	31.25
10	<i>E. coli</i>	7.8	15.6
	<i>S. aureus</i>	3.9	7.8
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
11	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	7.8	15.6
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
12	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5

Таблиця 2 (продовження)

Номер сполуки	Штами, що використовувались під час досліджень	Результат дослідження	
		МІК, мкг/мл	МБЦК (МФЦК для <i>C. albicans</i>), мкг/мл
13	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	125
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
14	<i>E. coli</i>	31.25	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	250
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5
15	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	31.25	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	125
16	<i>E. coli</i>	125	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	125
17	<i>E. coli</i>	62.5	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	125
	<i>P. aeruginosa</i>	31.25	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	125
18	<i>E. coli</i>	125	250
	<i>S. aureus</i>	62.5	250
	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	125
	<i>C. albicans</i>	62.5	62.5

Таким чином, в ряду досліджуваних сполук нами була встановлена залежність «хімічна структура – біологічна дія». Так, особливої уваги заслуговує 2-(5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-N'-(3-(5-нітрофуран-2-іл)аліліден)ацетогідразид (сполука 1, Табл. 1), для якого за відсутності радикала за N₄-атомом 1,2,4-тріазолового гетероциклу та в присутності молекули 3-(5-нітрофуран-2-іл)акриальдегіду були відмічені такі результати активності: *E. coli* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *S. aureus* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *P. aeruginosa* – МІК 31.25 мкг/мл, МБЦК 125 мкг/мл; *C. albicans* – МІК 15.6 мкг/мл, МФЦК 15.6 мкг/мл (сполука 1, Табл. 2).

При заміщенні в молекулі 2-(5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-N'-(3-(5-нітрофуран-2-іл)аліліден)ацетогідразиду (сполука 1, Табл. 1) 3-(5-нітрофуран-2-іл)акриальдегіду на 5-нітро-2-фуральдегід (сполука 2, Табл. 1) спостерігався дещо менший протимікробний ефект для штаму *C. albicans* та отримано такі дані: *E. coli* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *S. aureus* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *P. aeruginosa* – МІК 15.6 мкг/мл, МБЦК 125 мкг/мл; *C. albicans* – МІК 31.25 мкг/мл, МФЦК 31.25 мкг/мл (сполука 2, Табл. 2).

Варто відзначити, що введення метильного радикала за N₄-атомом 1,2,4-тріазолового циклу

та 3-(5-нітрофуран-2-іл)акриальдегіду в молекулу 2-(4-R-5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетогідразиду (сполука 3, Табл. 1) незначно зменшувало протимікробну активність для штаму *P. aeruginosa*, та, відповідно, зафіксовані такі результати: *E. coli* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *S. aureus* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *P. aeruginosa* – МІК 31.25 мкг/мл, МБЦК 250 мкг/мл; *C. albicans* – МІК 15.6 мкг/мл, МФЦК 15.6 мкг/мл (сполука 3, Табл. 2).

Слід також зауважити, що при заміщенні в молекулі 2-(4-метил-5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-N'-(3-(5-нітрофуран-2-іл)аліліден)ацетогідразиду 3-(5-нітрофуран-2-іл)акриальдегіду на 5-нітро-2-фуральдегід (сполука 4, Табл. 1) були відмічені дещо нижчі результати протимікробної активності: для *E. coli* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *S. aureus* – МІК 3.9 мкг/мл, МБЦК 7.8 мкг/мл; *P. aeruginosa* – МІК 31.25 мкг/мл, МБЦК 125 мкг/мл; *C. albicans* – МІК 31.25 мкг/мл, МФЦК 62.5 мкг/мл (сполука 4, Табл. 2).

Висновки

1. Проведено скринінг протимікробної активності іліденгідразидів 2-(4-R-5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)оцтових кислот.

2. Встановлена залежність «хімічна структура – біологічна дія» досліджуваних сполук.

3. Відмічено, що введення в молекули 2-(5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетогідразида та 2-(4-метил-5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетогідразида 3-(5-нітрофуран-2-іл)акриальдегіду, а також 5-нітро-2-фуральдегіду призводить до суттєвого збільшення протимікробної активності.

4. Найбільший протимікробний ефект виявляє 2-(5-(тіофен-2-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-N'-3-(5-нітрофуран-2-іл)аліден)ацетогідразид, внаслідок чого ця речовина розглядається як потенційний протимікробний засіб, і для неї розпочато проведення доклінічних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів. Стан проблеми та шляхи її вирішення / Ю.І. Феценко, М.І. Гуменюк, О.С. Денисов // Український хіміотерапевтичний журнал. — 2010. — № 1-2. — С. 4-10.
2. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів // Методичні рекомендації / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Ширококов та ін.; ДФЦ МОЗ України. — К., 2004. — 38 с.
3. Розробка технології і стандартизація таблетованих лікарських препаратів на основі похідних 1,2,4-тріазолів: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.03 / Л.І. Кучеренко. — Харків, 2010. — 44 с.
4. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості N- і S-замещенных 1,2,4-триазола: дис. ... д-ра фарм. наук / Е.Г. Книш. — Харьков, 1987. — 350 с.
5. Георгієвський Г.В. Аналітичне забезпечення синтезу, стандартизації та організації виробництва похідних 1,2,4-тріазолу та їх лікарських форм: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.03 / Г.В. Георгієвський. — Харків, 2013. — 44 с.
6. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 2-(5-R₁-R₂-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетатних кислот / Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г., Щербина Р.О. // Фарм. журнал. — 2008. — № 2. — С. 67-72.
7. Synthesis of some new 1,3,4-thiadiazol-2-ylmethyl-1,2,4-triazole derivatives and investigation of their antimicrobial activities / Demirbas A., Sahin D., Demirbas N., Karaoglu S.A. // Eur. J. Med. Chem. — 2009. — № 44. — P. 2896-2903.
8. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazoles / Padmavathi V., Sudhakar Reddy G., Padmaja A., Kondaiah P., Ali-Shazia // Eur. J. Med. Chem. — 2009. — № 44. — P. 2106-2112.
9. Drugresistance [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.who.int/drugresistance/use/ru/> (дата звернення — 19.06.13).
10. Antimicrobial resistance [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html> (дата звернення — 19.06.13).
11. Compendium, 2012 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://compendium.com.ua/inn/86/64589/voriconazolum> (дата звернення — 19.06.13).
12. Open Data Drug & Drug Target Database [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01167> (дата звернення — 19.06.13).
13. Posaconazole: clinical pharmacology and potential for management of fungal infections / Groll A., Walsh T. // Expert Rev. AntiInfect. Ther. — 2005. — № 34. — P. 467-87.
14. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives / Dodd M.C., Stillman W.B. // J. Pharmacol. Exptl. Therap. — 1944. — № 82. — P. 8-11.

УДК 547.792:615.28.015.11

Резюме

Салионов В.А., Панасенко А.И., Книш Е.Г., Камышный А.М., Полищук Н.Н.
Запорожский государственный медицинский университет

Противомикробная активность илиденгидразидов 2-(4-R-5-(тиофен-2-ил)-4H-1,2,4-триазол-3-илтіо)уксусных кислот

Проведен скрининг противомикробной активности в ряду илиденгидразидов 2-(4-R-5-(тиофен-2-ил)-4H-1,2,4-триазол-3-илтіо)уксусных кислот. Чувствительность микроорганизмов к синтезированным соединениям исследовали в соответствии с методическими рекомендациями. Во время исследований готовили ряд двукратных серийных разведений препарата в бульоне Мюллер-Хинтона в объеме 1 мл, после чего прибавляли в каждую пробирку по 0.1 мл микробной взвеси (10⁶ м.к./мл). Минимальную ингибирующую концентрацию определяли по отсутствию видимого роста в пробирке с минимальной концентрацией препарата, минимальную бактерицидную / фунгицидную концентрацию (МБЦК, МФЦК) — по отсутствию роста на агаре после высевания из прозрачных пробирок. В качестве растворителя соединений в исследованиях использовали диметилсульфоксид, исходные растворы довели до концентрации 1 мг/мл. Для первичного скрининга соединений были применены эталонные тест-культуры как грамположительных, так и грамтрицательных бактерий, принадлежащих к разным по морфо-физиологическим свойствам клинически значимым группам возбудителей инфекционных заболеваний. Дополнительно проведен контроль питательных сред и растворителя с помощью общепринятых методик.

Из полученных данных эксперимента установлена зависимость «химическая структура — биологическая действие» для исследуемых соединений. Так, наибольшим противомикробным эффектом обладает 2-(5-(тиофен-2-ил)-4H-1,2,4-триазол-3-илтіо)-N'-3-(5-нитрофуран-2-ил) алиден)ацетогидразид. Выявленное соединение может быть рекомендовано для дальнейших доклинических исследований в качестве потенциального противомикробного средства.

Ключевые слова: илиденгидразиды, 1,2,4-триазол, противомикробная активность.

UDC 547.792:615.28.015.11

Summary

Salionov V.A., Panasenko A.I., Knish E.G., Kamyshnyi A.M., Polishchuk N.N.
Zaporizhzhia State Medical University

Antimicrobial activity of the ylidenhydrazides of 2-(4-R-5-(thiophen-2-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetic acids

Screening of antimicrobial activity among the ylidenhydrazides of 2-(4-R-5-(thiophen-2-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetic acids was carried out. The sensitivity of microorganisms to the synthesized compounds was studied in accordance with methodical recommendations. During the researches a row of double serial dilutions of the drug in 1 ml of Muller-Hinton broth was prepared, then 0.1 ml of microbial suspension. (10⁶ m.c./ml) was added to each tube. Minimal inhibiting concentration was determined by the absence of visible growth in the tube with a minimal concentration of the drug, the minimal bactericidal / fungicidal concentration (MBtCs, MFtCs) was determined by the absence of growth on agar after seeding from transparent tubes. Dimethylsulfoxide was used as a solvent in researches; the initial solutions were adjusted to a concentration of 1 mg/ml. For primary screening research of compounds reference test-cultures both of gram-positive and gram-negative bacteria belonging to different morphological and physiological clinically significant groups of infectious diseases agents were used. Ad-

ditionally the control of nutrient media and solvent by means of generally accepted methods was held.

From the obtained experimental facts the dependence of «chemical structure – biological effect» has been established for the studied compounds. Thus, 2-(5-(thiophen-2-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)-N'-(3-(5-nitrofuranyl)allylidene)acetohydrazide has the highest antimicrobial effect. Detected compound can be recommended for further preclinical researches as a potential antimicrobial agent.

Keywords: ylidenhidrazydes, 1,2,4-triazol, antimicrobial activity.

Саліонов Володимир Олександрович. Здобувач, старший лаборант кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.

Панасенко Олександр Іванович. Д.фарм.н., професор, завідувач кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.

Книш Євгеній Григорович. Д.фарм.н., професор, завідувач кафедри управління та економіки фармації ЗДМУ.

Камишиний Олександр Михайлович. Д.мед.н., професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

Поліщук Наталія Миколаївна. К.мед.н., ст. викладач кафедри мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

УДК 615.07:615.224:615.453.6

Назарова О.С., Вербова Ю.М., Веселова О.А.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод»

Оцінка еквівалентності *in vitro* генеричного лікарського засобу в формі таблеток з кандесартану цилексетилом

Проведено вивчення кінетики розчинення лікарських препаратів у формі таблеток з кандесартану цилексетилом відповідно до вимог з проведення процедури «Біолейвер» згідно з рекомендаціями Державної Фармакопеї України і вимогами Всесвітньої організації охорони здоров'я. Зроблено висновок, що профілі розчинення *in vitro* (кінетичні криві розчинення) оригінального лікарського засобу «Атаканд» (Atacand®), таблетки по 8 мг і 16 мг (фірма Astra Zepes, Швеція), і препарату-генерика «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг і 16 мг, виробництва ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод» в середовищах розчинення з рН 1.2, 4.5 і 6.8 з додаванням солюбілізатора натрію додецилсульфату еквівалентні.

Ключові слова: кандесартану цилексетил, кінетика розчинення, *in vitro*, біолейвер, метод абсорбційної спектрофотометрії, таблетки.

На сьогоднішній день на фармацевтичному ринку України зареєстровано близько 13 тис. лікарських засобів (ЛЗ), при цьому більше 90 % з них — це генерики і традиційні препарати [1]. У рамках проблеми ефективності та безпеки відтворених ЛЗ важливе значення відводиться вивченню їх біодоступності та біоеквівалентності у порівнянні з оригінальними лікарськими препаратами (ЛП) [2]. Відмінності в якості субстанції, якісному або кількісному складі допоміжних речовин і технології виготовлення можуть істотно змінювати фармакокінетику і біодоступність відтвореного препарату по відношенню до оригіналу. З клінічної точки зору це означає зміну рівнів, а також часу досягнення необхідних значень концентрацій лікарських речовин (ЛР) у біологічних рідинах. Все це може змінюватися як у бік зменшення, так і в бік збільшення кількості ЛР, що призводить до недостатньої ефективності або розвитку несприятливих побічних реакцій при прийманні таких препаратів. Тому вибір якісної субстанції, оптимального складу і раціонального техно-

логічного процесу є першочерговим завданням виробництва ЛЗ.

Дослідження еквівалентності — це дослідження, які визначають еквівалентність між генеричними і референтними препаратами при проведенні досліджень *in vivo* та/або *in vitro*. Для доказу біоеквівалентності нового складу генерика оригінальному препарату недоцільно щоразу на стадії фармацевтичної розробки проводити дослідження *in vivo*. Тому дослідження *in vitro*, що дозволяють визначити швидкість і ступінь вивільнення/розчинення ЛР з лікарської форми (ЛФ), можуть бути використані як альтернативні дослідженням *in vivo* [3]. Дослідження еквівалентності *in vitro* — це комплексне дослідження, яке ґрунтується на класифікації діючих речовин згідно з Біофармацевтичною системою класифікації (БСК) і розчиненням препарату, а також включає порівняння профілів розчинення генеричних та референтних препаратів у трьох середовищах розчинення зі значеннями рН 1.2, 4.5 і 6.8 [2, 4].

Еквівалентність кінетики розчинення ЛП в формі таблеток оцінюють за значенням фактора

подібності (f_2) [2, 5], який повинен мати значення від 50 до 100 для можливості зробити висновок про відповідність кінетичних кривих:

$$f_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \sum_{i=1}^n (R_{(i)} - T_{(i)})^2]^{-0.5} \times 100 \},$$

де:

n — кількість точок контролю;

$R_{(i)}$ — середнє значення кількісного визначення активної субстанції, яка перейшла в розчин у кожній вказаній точці відбору, при дослідженні референтного препарату, у відсотках;

$T_{(i)}$ — середнє значення кількісного визначення активної субстанції, яка перейшла в розчин у кожній вказаній точці відбору, при дослідженні препарату-генерика, у відсотках.

Якщо за 15 хв вивільнення діючої речовини з препарату становить більше 85 %, то кінетику розчинення вважають еквівалентною без математичної оцінки.

У зв'язку з розробкою препарату-генерика в формі таблеток з кандесартаном цилексетилом необхідно було вивчити проблему висвітлення в науковій літературі питання дослідження розчинення, біодоступності та кількісного визначення даної активної фармацевтичної субстанції.

Кандесартану цилексетил за хімічною структурою так само, як і перший блокатор рецепторів ангіотензину II лозартан, є біфеніловим похідним тетразолу, однак він має більш високу ліпофільність [6], і являє собою кристалічний порошок білого або майже білого кольору, без запаху, легко розчинний у хлороформі, помірно розчинний в етанолі безводному, мало розчинний в ацетонітрилі і практично нерозчинний у воді ($< 8 \times 10^{-8}$ М). Кандесартану цилексетил являє собою рацемічну суміш, що містить один хіральний центр при групі циклогексидокси-карбонілокси-етилового ефіру [7]. Хімічна формула $C_{33}H_{34}N_6O_6$ і молекулярна вага 610.66. рKa кандесартану цилексетилу має значення 6.0 [8].

Після приймання внутрішньо кандесартану цилексетил перетворюється на активну речовину кандесартан. Абсолютна біодоступність кандесартану становить приблизно 40 % після приймання внутрішньо розчину кандесартану цилексетилу. Відносна біодоступність лікарської форми таблеток порівняно з тим же розчином для приймання внутрішньо становить близько 34 % із дуже незначною мінливістю. Розрахована абсолютна біодоступність таблетки таким чином становить 14 % [9]. Середній пік сироваткової концентрації (C_{max}) досягається че-

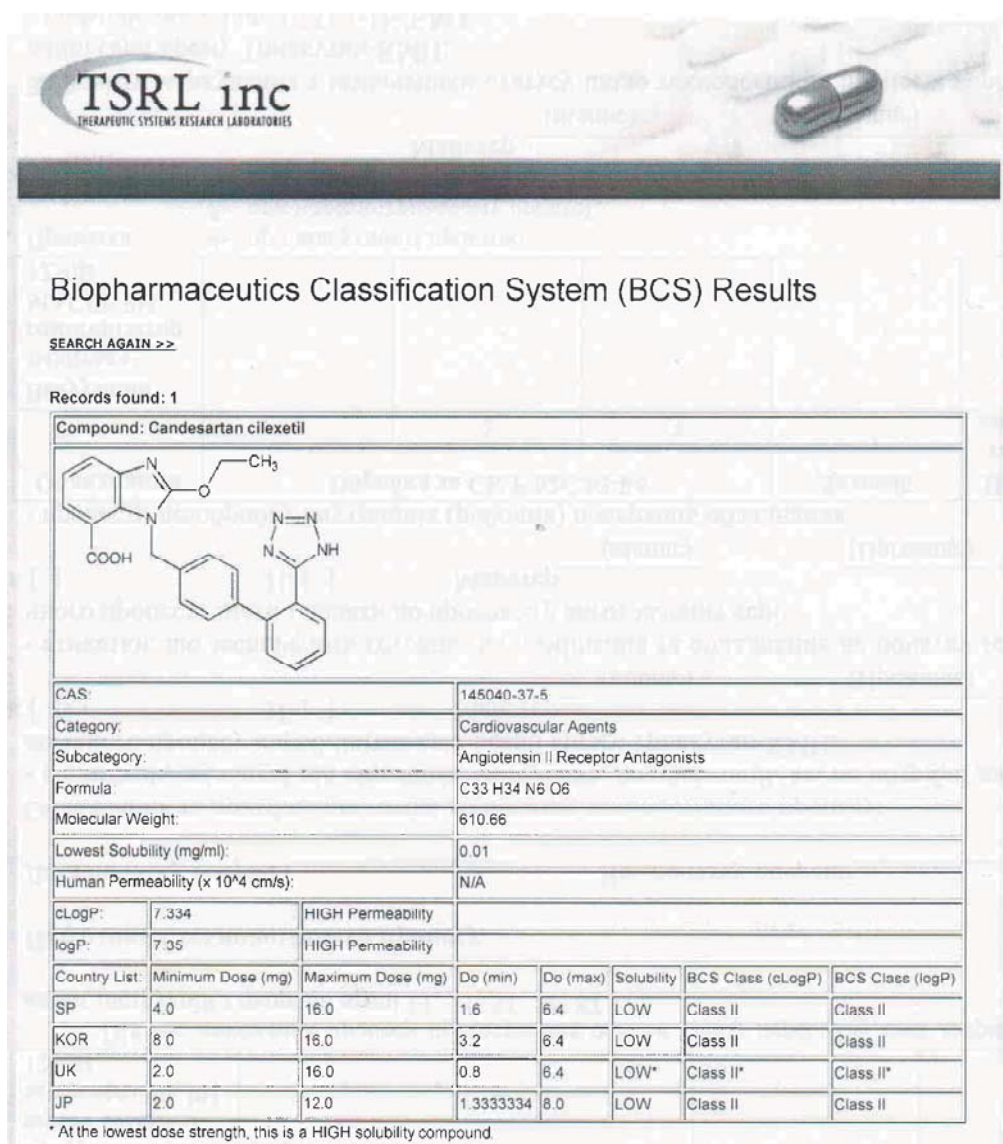
рез 3-4 години після приймання таблетки. Сироваткова концентрація кандесартану лінійно зростає зі збільшенням доз у межах терапевтичного діапазону дозування. Площа під кривою «сироваткова концентрація порівняно з часом» (AUC) кандесартану не зазнає істотних змін під впливом їжі. Кандесартан значною мірою зв'язується з білками плазми крові — понад 99 %. Уявний об'єм розподілу кандесартану становить 0.1 л/кг. Біодоступність кандесартану не зазнає змін під впливом їжі [10].

Відповідно до БСК кандесартану цилексетил належить до II класу, тобто до речовин з низькою біофармацевтичною розчинністю та високим ступенем проникнення [11]. На Рис. 1 наведена інтернет-сторінка з результатами БСК для кандесартану цилексетилу. Для II класу БСК можливе проведення порівняльних досліджень *in vitro* для підтвердження еквівалентності лікарських засобів твердій дозованій формі системної дії [12]. Ці дослідження доцільні також для вибору складу на етапі фармацевтичної розробки.

Для лікарських речовин II класу БСК, які мають слабкі кислі властивості, вивчення еквівалентності *in vitro* становить найбільший інтерес, оскільки розчинність для них є лімітуючою стадією потрапляння в системний кровообіг. Існують такі критерії еквівалентності *in vitro* відповідно процедурі «Біовейвер» для II класу БСК [12]:

- лікарські засоби мають такий самий або подібний кількісний і якісний склад, що й референтний препарат;
- лікарська речовина, що входить до складу препарату-генерика, характеризується слабкими кислотними властивостями і має високу розчинність при рН 6.8;
- лікарський засіб належить до «швидко розчинних» при рН 6.8;
- профілі розчинення еквівалентні в буферних середовищах зі значенням рН 1.2, 4.5 і 6.8 при використанні приладу з лопаттю (75 об/хв);
- відсутні допоміжні речовини, які впливають на абсорбцію лікарської речовини в шлунково-кишковому тракту.

Закордонними авторами [13] були проведені дослідження з розробки та оцінки таблеток кандесартану цилексетилу з негайним вивільненням. Ступінь вивільнення кандесартану цилексетилу оцінювали шляхом вивчення розчинення в 0.7 % розчині твіну-20 в 0.05 М фосфатному буферному розчині (900 мл, прилад с лопаттю 50 об/хв, точки відбору проб 10; 20; 30; 45 і 60 хв). Визначення концентрації кандес-



TSRL inc
THERAPEUTIC SYSTEMS RESEARCH LABORATORIES

Biopharmaceutics Classification System (BCS) Results

[SEARCH AGAIN >>](#)

Records found: 1

Compound: Candesartan cilexetil

CCOC(=O)N1C(=O)c2ccccc2N1Cc3ccc(cc3)-c4ccccc4N5=NN=CN5

CAS:	145040-37-5						
Category:	Cardiovascular Agents						
Subcategory:	Angiotensin II Receptor Antagonists						
Formula:	C33 H34 N6 O6						
Molecular Weight:	610.66						
Lowest Solubility (mg/ml):	0.01						
Human Permeability (x 10 ⁴ cm/s):	N/A						
cLogP:	7.334	HIGH Permeability					
logP:	7.35	HIGH Permeability					
Country List:	Minimum Dose (mg)	Maximum Dose (mg)	Do (min)	Do (max)	Solubility	BCS Class (cLogP)	BCS Class (logP)
SP	4.0	16.0	1.6	6.4	LOW	Class II	Class II
KOR	8.0	16.0	3.2	6.4	LOW	Class II	Class II
UK	2.0	16.0	0.8	6.4	LOW*	Class II*	Class II*
JP	2.0	12.0	1.3333334	8.0	LOW	Class II	Class II

* At the lowest dose strength, this is a HIGH solubility compound.

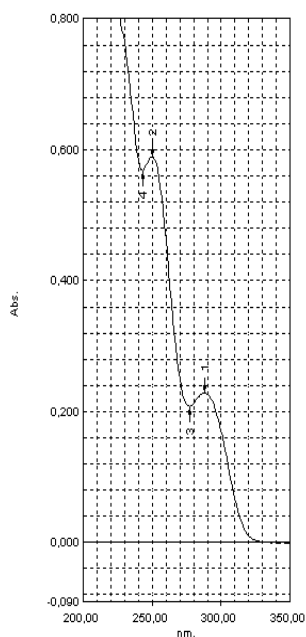
Интернет-сторінка з результатами Біофармацевтичної системи класифікації (БСК) для кандесартану цилексетилу (<http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>)

сартану цилексетилу в діалізаті проводили методом рідинної хроматографії (РХ). Для складу, який було обрано як оптимальний, за 10 хв і 20 хв вивільнилося близько 57 % і 95 % діючої речовини відповідно. Тоді як для складу комерційного продукту, який було обрано в якості референтного препарату, за ці ж проміжки часу вивільнилося близько 41 % і 74 % відповідно. Слід зазначити, що авторами цієї роботи [13] не проводився відбір проб в точці «15 хв», яка є визначальною [12], та якщо за даними, наведеними в цій науковій статті, провести розрахунок фактора подібності (f_2), то він буде становити близько 40 %. При виборі оптимального складу крім подібності профілів вивільнення враховували й інші фактори, а саме технологію виго-

товлення і стабільність модельних складів, що й було визначальною.

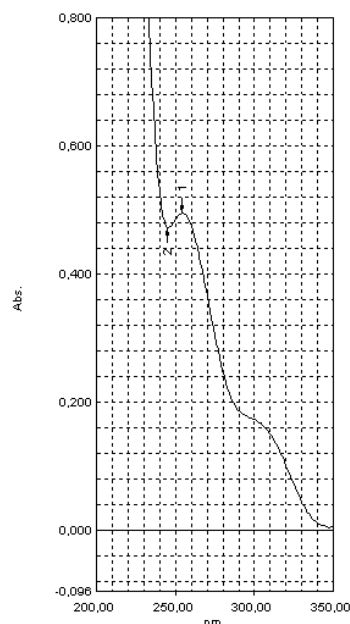
Також в літературі описані проведені науковцями дослідження [14] з розробки та перевірки тесту на розчинення для контролю якості таблеток, які містять 8 мг активного фармацевтичного інгредієнта кандесартану цилексетилу, з використанням оберненофазової РХ. В якості умов проведення тесту «Розчинення» були обрані такі: лопать зі швидкістю обертання 100 об/хв, 1000 мл 1 % лаурилсульфату натрію у воді, рН доводили до 6.8 3 М хлористоводневою кислотою. Вивільнення *in vitro* лікарського засобу оцінювали методом оберненофазової РХ з використанням в якості рухомої фази суміші розчинників: 0.02 М розчин калію

Рисунок 2



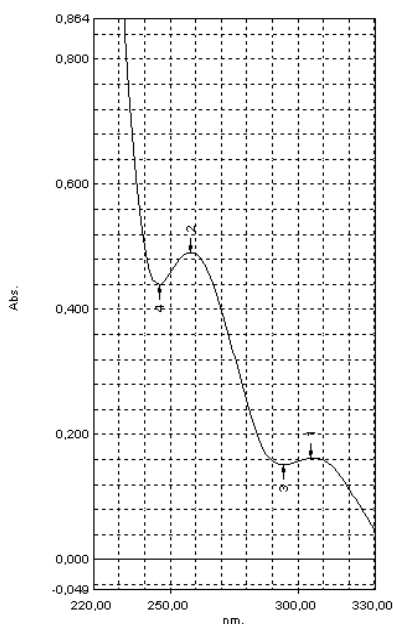
(a)

Wavelength nm.	Absorbance	Description
250.00	0.588	CO ⁻ Candesartan ⁻ pH1.2



(b)

Wavelength nm.	Absorbance	Description
255.00	0.495	CO ⁻ Candesartan ⁻ pH4.5



(c)

Wavelength nm.	Absorbance	Description
258.00	0.489	CO ⁻ Candesartan ⁻ pH6.8

Типові спектри поглинання кандесартану цилексетилу при вивченні кінетики розчинення

- (a) — в середовищі хлористоводневої кислоти рН 1.2.
- (b) — в середовищі ацетатного буферного розчину рН 4.5.
- (c) — в середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8.

Таблиця 1

Результати дослідження *in vitro* для підтвердження еквівалентності препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки, і «Атаканд», таблетки

№ п/п	Час, хв	Розчинення кандесартану циклосетилу, %	
Середовище з хлористоводневою кислотою рН 1.2			
		«Атаканд», таблетки по 8 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг
1	10	85.93	87.44
2	15	96.04	96.47
3	20	99.70	98.24
4	30	102.73	100.02
5	45	102.99	101.26
Фактор подібності f_2 не розраховують		За 15 хв вивільняється більше 85 % речовини	
		«Атаканд», таблетки по 16 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг
1	10	77.47	91.91
2	15	90.29	96.50
3	20	95.85	98.86
4	30	101.14	100.45
5	45	102.97	101.33
Фактор подібності f_2 не розраховують		За 15 хв вивільняється більше 85 % речовини	
Ацетатний буферний розчин рН 4.5			
		«Атаканд», таблетки по 8 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг
1	15	48.00	49.33
2	45	73.71	75.82
3	90	91.43	93.26
4	120	93.31	93.31
Фактор подібності f_2		$f_2 = 84 \geq 50$	
		«Атаканд», таблетки по 16 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг
1	15	51.55	47.27
2	45	74.52	73.23
3	90	91.11	91.32
4	120	93.73	93.68
Фактор подібності f_2		$f_2 = 74 \geq 50$	
Фосфатний буферний розчин рН 6.8			
		«Атаканд», таблетки по 8 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг
1	15	99.48	97.38
2	30	101.89	98.22
3	45	103.57	99.14
Фактор подібності f_2 не розраховують		За 15 хв вивільняється більше 85 % речовини	
		«Атаканд», таблетки по 16 мг	«Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг
1	15	101.26	100.41
2	30	102.73	101.95
3	45	104.13	102.58
Фактор подібності f_2 не розраховують		За 15 хв вивільняється більше 85 % речовини	

дигідрофосфату - ацетонітрил - триетиламін у співвідношенні (40:60:02) і доводили рН до 6.0 за допомогою фосфорної кислоти при швидкості потоку 1 мл/хв, детектування за довжини хвилі 254 нм, хроматографічна колонка заповнена октадецилсилільним силікагелем для хроматографії (С18).

У науковій літературі є дані про розробку методик кількісного визначення кандесартану циклосетилу в фармацевтичних препаратах з використанням методів спектрофотометрії і спектрофлуориметрії у порівнянні з методом РХ. Перший метод заснований на УФ-поглинанні при 270 нм у фосфатному буфері,

що містить цетилтриметиламонію бромід і метанол при рН 6.5. Другий спосіб заснований на збудженні та емісії флуоресценції при 260 нм і 384 нм відповідно у фосфатному буфері, що містить додецилсульфат натрію і метанол при рН 4.0 [15].

Таким чином, на підставі наукових даних встановлено, що субстанція кандесартану цилексетилу практично нерозчинна у воді, належить до II класу БСК, для якого можливо проведення порівняльних досліджень *in vitro* для підтвердження еквівалентності лікарських засобів твердій дозованих формі системної дії, а в якості методу кількісного визначення можливе використання як методу РХ, так і методу абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області.

Метою даної роботи є вивчення кінетики розчинення лікарських препаратів у твердій дозованій лікарській формі з кандесартану цилексетилом для оцінки їх еквівалентності в умовах *in vitro* для проведення фармацевтичної розробки генеричного ЛЗ у формі таблеток.

Результати дослідження та їх обговорення

Як об'єкти дослідження вивчали: препарат-генерик «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг і 16 мг (виробництва ПАТ «Луганський хімікофармацевтичний завод», Україна); референтний препарат «Атаканд» (Atacand[®]), таблетки по 8 мг і 16 мг (виробництва фірми Astra Zeneca, Швеція). Ці препарати містять однакову кількість однієї активної субстанції кандесартану цилексетилу та однакові допоміжні речовини в однаковій лікарській формі, тобто є фармацевтично еквівалентними препаратами.

Як стандарт використовували стандартний зразок (СЗ) кандесартану цилексетилу (фірма Zhejiang Tianyu Pharmaceutical Co. LTD, Китай).

Аналітичні дослідження проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області на спектрофотометрі UV-1700 фірми Shimadzu (Японія), на приладі для розчинення твердих дозованих форм Erweka (Німеччина), тип «Лопатеві мішалка», також використовували аналітичні ваги ВА 210-S фірми Sartorius (Швейцарія), рН-метр МР-512 (Китай).

Вивчення кінетики розчинення проводили відповідно до монографії ДФУ 5.Н.2. «Дослідження біодоступності та біоеквівалентності генеричних лікарських засобів» [12], Настанови з дослідження біодоступності та біоеквівалентності [16], методичних рекомендацій [2], а також Керівництва Всесвітньої організації охорони здоров'я [5] в трьох буферних сере-

довищах з різними значеннями рН: у розчині хлористоводневої кислоти рН 1.2, ацетатному буферному розчині рН 4.5 та фосфатному буферному розчині рН 6.8. Усі буферні розчини готували згідно з ДФУ, Доповнення 2, 2.9.3, с. 141. Дегазацію середовищ розчинення проводили шляхом нагрівання до температури (40 ± 2) °С з подальшою фільтрацією під вакуумом крізь мембранний фільтр з розміром пор 45 мкм й інтенсивним перемішуванням під вакуумом протягом 5 хв.

Умови проведення тесту «Розчинення»: апарат Erweka, використовуючи прилад із лопаттю; об'єм середовища розчинення — 450 мл для таблеток по 8 мг і 900 мл для таблеток по 16 мг; температура середовища розчинення — (37.0 ± 0.5) °С; швидкість обертання лопаті — 75 об/хв. Відбір проб проводили в середовищі з хлористоводневою кислотою рН 1.2 через 10; 15; 20; 30 і 45 хв, у середовищі ацетатного буферного розчину рН 4.5 через 15; 45; 90 і 120 хв, у середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8 через 15; 30 і 45 хв. Проби відбирали вручну піпеткою місткістю 10.0 мл з ділянки посередині між поверхнею середовища розчинення і кошиком на відстані 2 см від стінки посудини для розчинення. Отримані проби фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка». Відібраний об'єм компенсували відповідним середовищем розчинення. Для отримання статистично достовірних результатів дослідження проводили на 12 зразках кожного з об'єктів дослідження.

Для кожного інтервалу часу проводили розрахунок стандартного відхилення середнього значення (*SD*), яке має витримувати такі вимоги: має бути менше 10 %, починаючи з другої і до останньої точки контролю; менше 20 % для першої часової точки.

Кількісне визначення кандесартану цилексетилу, який перейшов у середовище розчинення, при проведенні досліджень *in vitro* проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області. Оптичну густину випробовуваних розчинів вимірювали в максимумі поглинання за довжини хвилі 250 нм (для рН 1.2), або 255 нм (для рН 4.5), або 258 нм (для рН 6.8) у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин відповідне середовище розчинення. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння (СЗ кандесартану цилексетилу). Типові спектри поглинання кандесартану цилексетилу при вивченні кінетики розчинення наведені на Рис. 2. Методика кількісного визначення кандесартану цилексетилу з використанням методу абсорбційної спектрофотометрії в ульт-

трафіолетовій області валідована за основними параметрами: специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність та діапазон застосування [17].

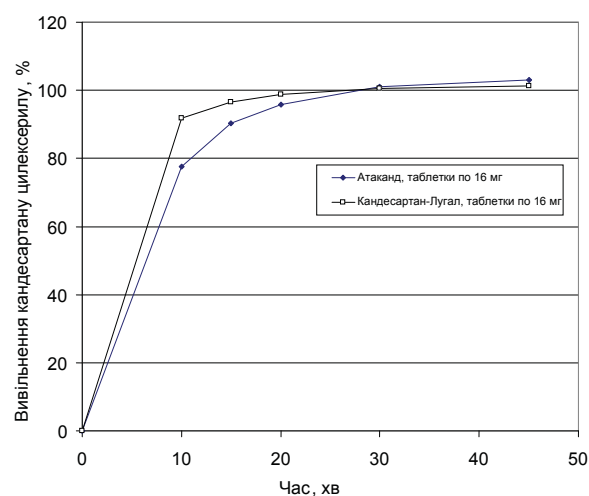
Оскільки проведені нами дослідження показали, що за 45 хв у середовищах з хлористоводневою кислотою рН 1.2 і ацетатному буферному розчині рН 4.5 ступінь розчинення препаратів становить менше 2 %, а в середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8 — менше 10 %, встановлено, що для досягнення необхідного ступеня розчинення кандесартану циклкетилу дослідження доцільно проводити у середовищах розчинення з додаванням сольобілізатора [18] (поверхнево-активної речовини). В якості сольобілізатора нами було обрано натрію додецилсульфат (0.1-2.0 %).

В Табл. 1 наведені результати дослідження *in vitro* для підтвердження еквівалентності досліджуваних препаратів: значення розчинення кандесартану циклкетилу в кожній часовій точці та розраховане значення фактора подібності. Кінетичні криві розчинення кандесартану циклкетилу для препарату-генерика «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг і 16 мг, і референтного препарату «Атаканд» (Atacand®), таблетки по 8 мг і 16 мг, в трьох середовищах розчинення наведені на Рис. 3-8.

На підставі отриманих нами даних встановлено, що для досліджуваних препаратів спостерігається еквівалентність профілів розчинення для всіх досліджуваних середовищ розчинення (рН 1.2, 4.5 і 6.8). В середовищі з хлористоводневою кислотою рН 1.2 і в середовищі фосфат-

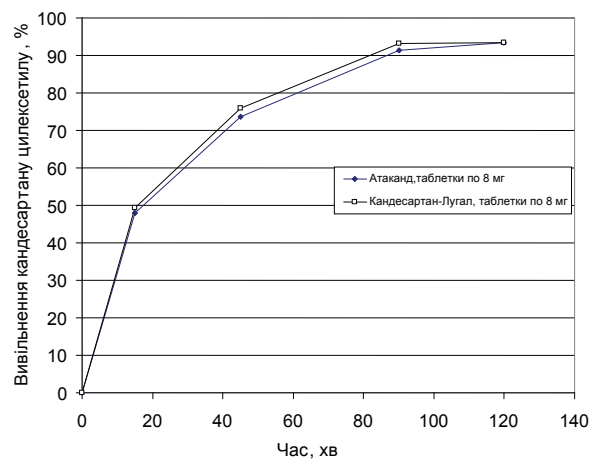
ного буферного розчину з рН 6.8 за 15 хв більше 85 % діючої речовини переходить у розчин, отже профілі розчинення (кінетичні криві розчинення) даних препаратів в цих середовищах подібні, а препарати в них є дуже швидко розчинними. Фактор подібності профілів розчинення (f_2), розрахований для середовища розчинення ацетатного буферного розчину з рН 4.5, перевищує значення 50, отже профілі розчинення (кінетичні криві розчинення) даних препаратів в цьому середовищі також подібні. Величина стандартного відхилення (SD) для всіх результатів не перевищує 10 %, що відповідає

Рисунок 4



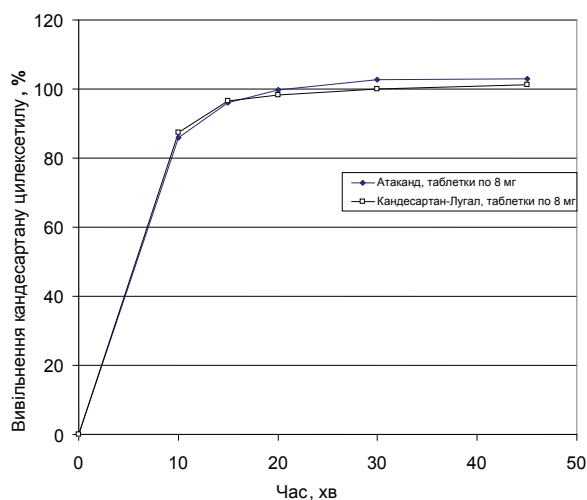
Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг, і «Атаканд», таблетки по 16 мг, в середовищі з хлористоводневою кислотою рН 1.2 (n = 12)

Рисунок 5



Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг, і «Атаканд», таблетки по 8 мг, в середовищі ацетатного буферного розчину рН 4.5 (n = 12)

Рисунок 3

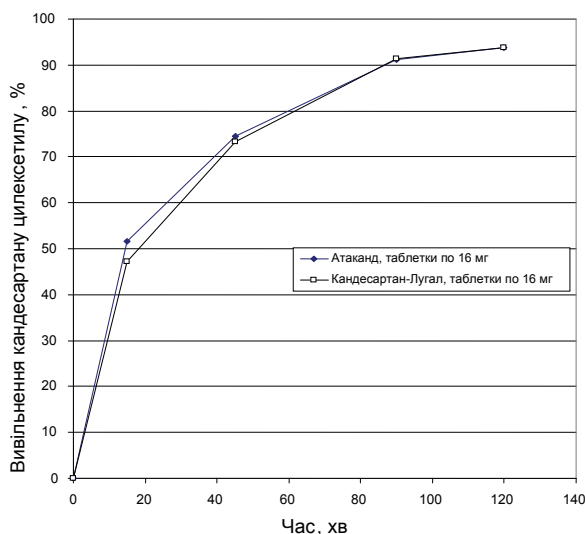


Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг, і «Атаканд», таблетки по 8 мг, в середовищі з хлористоводневою кислотою рН 1.2 (n = 12)

вимогам, що висуваються до даної величини відповідно до ДФУ, 5.N.2 [12].

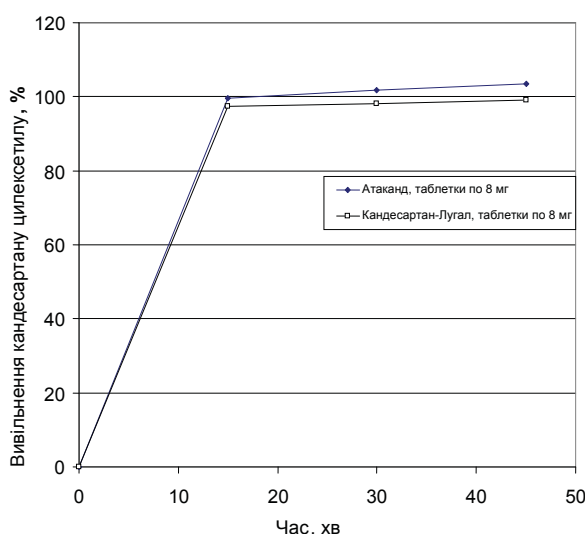
Ацетатний буферний розчин з рН 4.5 є найбільш показовим як середовище розчинення для порівняння ступеня розчинення кандесартану цилексетилу, оскільки вивільнення в цей розчин проходить поступово і це середовище розчинення може бути рекомендоване як першочергове для встановлення подібності кінетичних кривих при проведенні фармацевтичної розробки препаратів в формі таблеток з кандесартану цилексетилом.

Рисунок 6



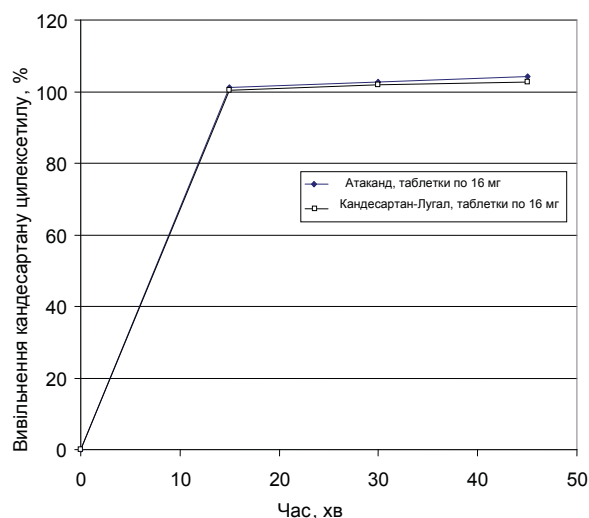
Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг, і «Атаканд», таблетки по 16 мг, в середовищі ацетатного буферного розчину рН 4.5 (n = 12)

Рисунок 7



Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг, і «Атаканд», таблетки по 8 мг, в середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8 (n = 12)

Рисунок 8



Профілі кінетики розчинення препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 16 мг, і «Атаканд», таблетки по 16 мг, в середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8 (n = 12)

Еквівалентність генеричного ЛЗ «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг і по 16 мг, і референтного препарату «Атаканд», таблетки по 8 мг і по 16 мг, до складу яких входить діюча речовина кандесартану цилексетил, що належить до II класу БСК, доведена за результатами досліджень *in vitro*, а саме тим, що препарати швидко розчиняються (більше 85 % діючої речовини переходить у розчин за 30 хв і менше) у буферному розчині рН 6.8 при використанні приладу з лопаттю (75 об/хв), що відповідає вимогам ДФУ [12].

Висновки

Встановлено, що результати вивчення кінетики розчинення, статистична обробка та значення фактора подібності доводять еквівалентність профілів розчинення *in vitro* досліджуваних препаратів «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг і по 16 мг, виробництва ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод», м. Луганськ, Україна, і референтних препаратів «Атаканд», таблетки по 8 мг і по 16 мг, виробництва фірми Astra Zeneca, Швеція, при рН 1.2, 4.5 і 6.8.

ЛІТЕРАТУРА

- О. Соловійов: в Україні більше 90 % зареєстрованих препаратів - генерики і традиційні ліки // Аптека (on line). – 2012. – № 41(862). – Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/165900>
- Головенко М. Я. Біофармацевтична класифікаційна система / М. Я. Головенко, О. П. Баула, І. Ю. Борисюк. – К.: Авіцена. – 2010. – 299 с.
- Чиждова Д. А. Фармакокінетическая и биофармацевтическая оценка качества твердых лекарственных форм методами *in vitro* и *in vivo*: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 14.00.25 «Фармакологи-

гия, клиническая фармакология» / Д. А. Чижова. — Москва, 2009. — 24 с.

4. Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. — US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). — August 2000. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>

5. Who Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series 937, Fortieth Report, Geneva. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf

6. Сиренко Ю.Н. Место кандесартана в современной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: обзор доказательств / Ю.Н. Сиренко, Н.В. Донченко // Артериальная гипертензия. — 2011. — № 4 (18). — С. 114-126.

7. Patent 7098342 B2 United States МПК⁶ C07D 403/08, C07D 257/04. Preparation of Candesartan cilexetil / Etinger M.Y., Fedotov V., Dolitzky B. — № 10/968 710; — заявл. 18.10.2004; опубл. 29.08.2006.

8. pKa determination of angiotensin II receptor antagonistic (ARA II) by spectrofluorimetry / E. Cagigal, L. Gonzalez, R.M. Alonso [et.al.] // J Pharm Biomed Anal. — 2001. — № 26. — P. 477-486.

9. Candesartan cilexetil in cardiovascular disease / A. Ross, V. Papademetriou // Expert Rev. Cardiovascular Ther. — 2004. — № 2. — P. 829-835.

10. Інструкція для медичного застосування препарату «Атаканд». — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=31522>

11. Therapeutic System Research Laboratories. Biopharmaceutics Classification System (BCS) Results. — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm> (дата звернення: 3 березня 2014 р.)

12. 5.N.2. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності генеричних лікарських засобів // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 231.

13. Formulation and evaluation of candesartan cilexetil immediate release tablets / Jampani Neeharika [et.al.] // International Research Journal of Pharmacy. — 2012. — № 3(7). — P. 271-284.

14. Development and validation of a dissolution test for Candesartan cilexetil in tablet forms using reverse phase — High performance liquid chromatography / R. Revathi, T. Ethiraj, Jhansi L. Marreddy [et.al.] // J. Pharm. Educ. Res. — 2011. — Vol. 2, № 2. — P. 71-77.

15. Flow injection spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of candesartan cilexetil in pharmaceutical formulations / A. Khalid, A. Waseem, I. Afzal [et.al.] // Scientific Research and Essays. — 2011. — Vol. 6 (29). — P. 6203-6208.

16. Настанова з клінічних досліджень. Лікарські засоби. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності: Настанова 42-7.1:2005 / Державний фармакологічний центр МОЗ України і ДП «Державний науковий центр лікарських засобів». Розроб.: В. І. Мальцев, М.О. Ляпунов та ін. — Офіц. вид. — Київ: МОЗ України [Моріон], 2005. — 22 с.

17. Назарова О.С. Розробка методики кількісного визначення кандесартану цилексетилу в лікарському препараті в формі таблеток / О.С. Назарова, Ю.М. Вербова, Р.П. Калинин // Фармаком. — 2013. — № 2. С. 37-43.

18. Раменская Г.В. *In vivo* — *in vitro* корреляция (IVIVC): современный инструмент для оценки поведения лекарственных форм в условиях *in vivo* / Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, К.С. Давыдова [и др.] // Медицинский альманах. — 2011. — № 1 (14). — С. 222-226.

УДК 615.07:615.224:615.453.6

Резюме

Назарова Е.С., Вербова Ю.М., Веселова Е.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения»

ПАО «Луганский химико-фармацевтический завод»

Оценка эквивалентности *in vitro* генерических лекарственных средств в форме таблеток с кандесартана цилексетилом

Проведено изучение кинетики растворения лекарственных препаратов в форме таблеток с кандесартана цилексетилом в соответствии с требованиями по проведению процедуры «Биовайвер» согласно рекомендациям Государственной Фармакопеи Украины и требованиям Всемирной организации здравоохранения. Сделан вывод, что профили растворения *in vitro* (кинетические кривые растворения) оригинального лекарственного средства «Атаканд» (Atacand®), таблетки по 8 мг и 16 мг (фирма Astra Zeneca, Швеция), и препарата-генерика «Кандесартан-Лугал», таблетки по 8 мг и 16 мг, производства ПАО «Луганский химико-фармацевтический завод» в средах растворения с pH 1.2, 4.5 и 6.8 с добавлением солюбилизатора натрия додецилсульфата эквивалентны.

Ключевые слова: кандесартана цилексетил, кинетика растворения, *in vitro*, биовайвер, метод абсорбционной спектрофотометрии, таблетки.

UDC 615.07:615.224:615.453.6

Summary

Nazarova E.S., Verbova J.M., Veselova O.A.

State Enterprise «State Scientific Center for Drugs and Medical Products», Kharkiv

Public joint-stock company «Lugansk chemical and pharmaceutical plant», Lugansk

Assessment of *in vitro* equivalence of generic drug in tablet form with candesartan cilexetil

The study of dissolution kinetics of tablets with candesartan cilexetil according to the requirements of the «Biowaiver» procedure set in the recommendations of State Pharmacopoeia of Ukraine and WHO requirements was carried out.

Quantitative determination of candesartan cilexetil transferred to the dissolution medium during *in vitro* studies was performed by absorption spectrophotometry in the ultraviolet region. Absorbance of the test solution was measured at the absorption maximum at the wavelength 250 nm (pH 1.2) or 255 nm (pH 4.5) or 258 nm (pH 6.8).

In the dissolution medium containing hydrochloric acid pH 1.2 and in the dissolution medium containing phosphate buffer solution with pH 6.8 for 15 min more than 85 % of the active substance dissolves hence dissolution profiles *in vitro* of these drugs in these dissolution media are similar and the drugs are «very rapidly» dissolving. Similarity factor of dissolution profiles (f_2), calculated for the dissolution medium acetate buffer, pH 4.5 exceeds 50 thus *in vitro* dissolution profiles of these drugs in this medium are also similar. It is concluded that the *in vitro* dissolution profiles (dissolution kinetic curves) of the original medicinal product «Atacand®», tablets 8 mg and 16 mg («Astra Zeneca», Sweden) and generic drug «Candesartan-Lugal», tablets 8 mg and 16 mg of PSC «Lugansk chemical and pharmaceutical plant» in the dissolution medium with a pH of 1.2, 4.5 and 6.8 with the addition of solubilizing agent sodium dodecyl sulfate are equivalent.

Keywords: candesartan cilexetil, dissolution kinetics, *in vitro*, biowaiver, absorption spectrophotometry, tablet.

Назарова Олена Сергіївна. Зав. лаб. аналізу, якості та стандартизації лікарських препаратів Державного підприємства «Державний науковий центр

лікарських засобів і медичної продукції» (з 2009 р.), к.фарм.н. (2005 р.).

Вербова Юлія Михайлівна. Наук. співроб. лаб. аналізу, якості та стандартизації лікарських препаратів Державного підприємства «Державний науковий

центр лікарських засобів і медичної продукції» (з 2009 р.).

Веселова Олена Андріївна. Начальник виробничо-технічного відділу ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод».

Фармакологічні дослідження

УДК 615.322:615.276:616-002:616.64

Яковлева Л.В., Єгорова О.О., Кошова О.Ю., Ларьяновська Ю.Б.
Національний фармацевтичний університет
Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського, м. Сімферополь

Вплив елгацину на вікові зміни морфоструктури сім'яників та передміхурової залози щурів

Проведено вивчення впливу й тривалості дії нового антиоксидантного препарату – таблеток «Елгацин» – на зміни морфоструктури сім'яників та передміхурової залози щурів при старінні. Елгацин вводили щурам двома курсами по 30 діб щодобово у дозі 12 мг/кг. Перший курс – у віці 12 місяців, другий – у 15.5 місяців. Гістологічне дослідження тканин сім'яників та передміхурової залози проводили одразу після закінчення курсу елгацину і через 1 і 2 місяці після. При старінні спостерігається зниження відносної маси сім'яників та простати. Змінюється морфоструктура цих органів: поступово вгасають процеси сперматогенезу та знижується функціональна активність клітин Сертолі та Лейдига. У 18.5-місячному віці підвищується відсоток тварин з повним асперматогенезом. У просвіті окремих ацинусів простатичних залоз накопичуються конкременти, що є відомою морфологічною ознакою старіння чоловічого організму.

Профілактичне введення елгацину самцям щурів у зрілому та пізньому зрілому віці уповільнює швидкість вікових змін тканин сім'яників та простати. Тривалість дії препарату зберігається протягом двох місяців після введення елгацину, але найбільш виразна позитивна дія спостерігається при повторному введенні щурам у пізньому зрілому віці. Отримані дані свідчать про виразну геропротекторну дію елгацину та обґрунтовують доцільність його подальшого фармакологічного вивчення.

Ключові слова: старіння, репродуктивна система, сперматогенез, сім'яники, передміхурова залоза, антиоксиданти, елгацин.

Одним з пріоритетних завдань сучасної геронтології є профілактика прискороного старіння та вікових патологій, яка спрямована на збільшення середньої тривалості життя і збереження активного довголіття людини [1]. Зростання психоемоційної напруги внаслідок стресових навантажень, незбалансоване харчування та гіподинамія призводять до виснаження функціональних можливостей організму та є вагомими факторами прискороного старіння населення [2]. Зниження адаптивних можливостей організму призводить до раннього прояву збоїв генеративної функції та з віком все більше сприяє дисфункції репродуктивної системи, особливо її найбільш уразливого компонента – статеві функції. Тому підвищення адаптаційного резерву організму відіграє важливу роль у профілактиці передчасного старіння та підтримці репродуктивної системи літніх чоловіків на функціональному рівні [3].

Численні роботи свідчать про те, що вільнорадикальна патологія, поряд з винятковою роллю універсальної патогенетичної ланки різних захворювань (атеросклерозу, ішемічної хворо-

би серця, захворювань печінки та ін.), є також причиною старіння [4, 5, 6]. Тому застосування антиоксидантних засобів з метою уповільнення процесів старіння організму є обґрунтованим.

Об'єктом дослідження геропротекторних властивостей обраний поліфенольний оригінальний препарат — таблетки «Елгацин». Діючими компонентами елгацину є елаготаніни, вилучені з суплідь (шишок) вільхи клейкої і сірої (*Alnus glutinosa* L., *A. cinerea* L.) род. березові (*Betulaceae*). У центральній науково-дослідній лабораторії Національного фармацевтичного університету (ЦНДЛ НФаУ) проводиться дослідження геропротекторних властивостей елгацину. В дослідженнях на щурах різного віку встановлено, що препарат уповільнює вікові зміни у печінці, серці та зміни вуглеводного й ліпідного обмінів [7].

Метою представленого фрагмента роботи стало вивчення впливу елгацину на зміни морфоструктури сім'яників та передміхурової залози щурів при старінні, визначення тривалості

цієї дії, що дозволить обґрунтувати термін повторного курсу введення препарату.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 96 статевозрілих неінбредних білих самцях щурів різного віку, отриманих з віварію ЦНДЛ НФаУ. Під час експерименту тварини знаходилися у стандартних умовах при температурі (18-24) °С, вологості 50-60 %, природному світловому режимі «день-ніч», на збалансованому харчовому раціоні при вільному доступі до води [8]. Маніпуляції з тваринами здійснювали з дотриманням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [9].

Для визначення впливу елгацину на вікові зміни морфоструктури сім'яників та передміхурової залози та тривалості цієї дії таблетки елгацину вводили щурам повторними курсами протягом 1 місяця з перервою на два місяці. Перше введення здійснювали тваринам у віці 12 місяців, повторний курс проводили у віці 15.5 місяців. Таблетки елгацину вводили внутрішньошлунково у дозі 12 мг/кг (за вмістом субстанції у таблетці). Гістологічне дослідження тканин сім'яників та передміхурової залози проводили одразу після закінчення курсу елгацину (у віці 13 місяців), протягом післядії засобу у віці 14, 15 і 16.5 місяців та після другого курсу елгацину (у віці 15.5 місяців) — одразу по його закінченні — у віці 16.5 та 17.5 і 18.5 місяців поспіль.

Як контроль використовували:

а) інтактних щурів 6-місячного віку (група інтактного репродуктивного контролю);

б) інтактних щурів відповідно 13, 14, 15.5, 16.5, 17.5 і 18.5-місячного віку (віковий контроль).

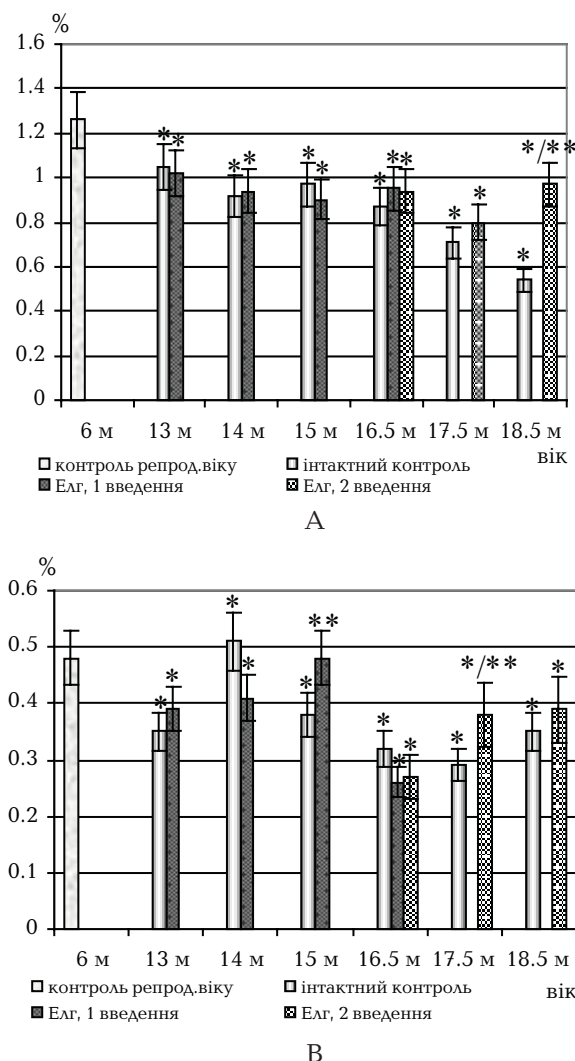
Тварин виводили з експерименту передозуванням ефірного наркозу, вилучали статеві органи, зважували їх. Розрахунок відносної маси проводили за формулою:

$$MK = \frac{M_{\text{органу,г}}}{M_{\text{тварини,г}}} \times 100.$$

Для морфологічного дослідження статеві органи фіксували у 10 % розчині формаліну та заливали у целоїдин-парафін. Зрізи зазначених органів фарбували гематоксиліном та еозином [10, 11]. Перегляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400, мікрофотографування здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500.

Отримані експериментальні дані обробляли за допомогою пакета статистичних програм Statistica, v. 6.0. Для отримання статистичних висновків застосовували критерій Н'юмана-

Рисунок 1



Вплив елгацину на масові коефіцієнти передміхурової залози і сім'яники щурів при старінні

Примітки:

контроль репрод. віку — молоді інтактні тварини репродуктивного віку (6 місяців);
інтактний контроль — інтактні тварини вікового контролю (13, 14, 15, 16.5, 17.5 і 18.5-місячного віку);
Елг, 1 введення — тварини різного віку (13, 14, 15, 16.5 місяців), яким у віці 12 місяців вводили елгацин;
Елг, 2 введення — тварини різного віку (16.5, 17.5 і 18.5 місяців), яким у віці 15.5 місяців повторно вводили елгацин у дозі 12 мг/кг протягом 1 місяця.

* — відхилення вірогідне щодо значень інтактного контролю (6-місячних щурів), $p < 0.05$;

** — відхилення вірогідне щодо значень інтактного вікового контролю, $p < 0.05$.

Кейлса. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0.05$.

Результати та їх обговорення

Як показало проведене дослідження, при старінні спостерігається інволюція статевих органів, причому найбільш виражено цей процес

відбувається у сім'яниках. У 13-місячних тварин (зрілого репродуктивного віку) відносна маса сім'яників була достовірно нижчою за показники інтактних щурів молодого репродуктивного віку (6 місяців) у 1.2 рази і продовжувала поступово знижуватися при подальшому старінні тварин. У порівнянні з 6-місячними тваринами відносна маса сім'яників 15-місячних щурів (зрілого пізнього віку) була меншою у 1.3 рази, а у тварин віком 18.5 місяців (передстаречого) – у 2.3 рази (Рис. 1 А). Відносна маса простати щурів також знижується з віком, але дещо менш виражено, залишаючись у всіх досліджених вікових категоріях приблизно на одному рівні (Рис. 1 Б).

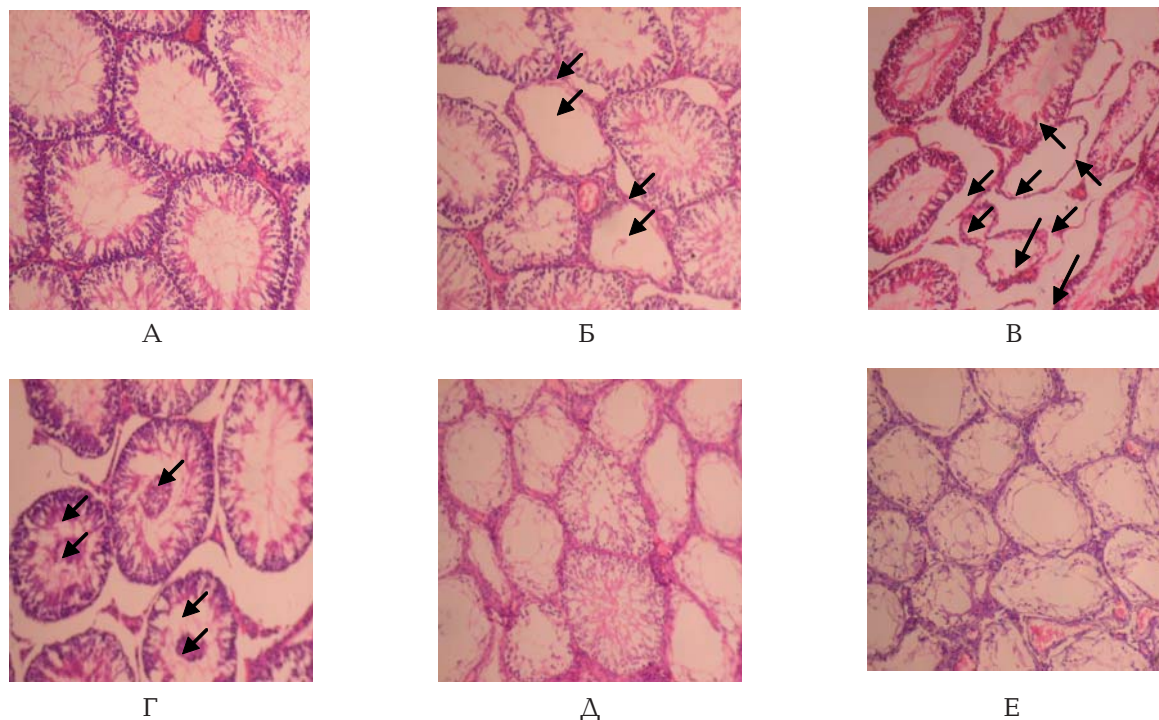
Введення таблеток елгацину повторними курсами суттєво не впливало на динаміку зміни маси статевих органів щурів різного віку, за винятком (16.5-18.5)-місячних щурів, яким вводили елгацин двічі: у 12 місяців та у 15.5 місяців (Рис. 1 А). У цих тварин спостерігали виразну тенденцію до підвищення відносної маси сім'яників та простати (Рис. 1 А, Б).

Дослідження морфоструктури сім'яників інтактних щурів різного віку

Тканина сім'яників інтактних щурів молодого та зрілого репродуктивного віку (6 місяців і 13-14 місяців) мала типову гістологічну будову. Часточки заповнені концентричними або сплюсненими профілями сім'яних канальців звичайного розміру, досить щільно розташованими, з широкими просвітами. Стінка сім'яних канальців утворена досить широкою стрічкою сперматогенного епітелію, в якій видно 3-4 генерації статевих клітин. Статеві клітини розташовані впорядковано, концентричними шарами згідно зі стадіями сперматогенного циклу. Процес сперматогенезу представлений у повному обсязі. Стан клітин Сертолі та клітин Лейдига у нормі (Рис. 2 А).

Починаючи з 15-місячного віку в більшості сім'яних канальців візуально відзначали деяке звуження ширини стрічки сперматогенного епітелію. В той же час всі типи статевих клітин у ній добре простежувалися. У поодиноких щурів на тлі нормального процесу сперматогене-

Рисунок 2



Сім'яники 13 (А), 15 (Б), 16.5 (В-Г), 17.5 (Д) та 18.5-місячного (Е) інтактних щурів (гематоксилін-еозин, ×150)

- А — сім'яні канальці в нормі, процес сперматогенезу не порушено, видно різні за розміром порожнини — ліпідні включення у цитоплазмі суспенцитів та статевих клітин.
- Б — поодинокі сім'яні канальці з відсутніми статевими клітинами (стрілка).
- В — група сім'яних канальців з відсутністю статевих клітин (стрілка).
- Г — злуцнення епітелію на тлі нормального процесу сперматогенезу в інших канальцях (стрілка).
- Д-Е — майже повне пригнічення сперматогенезу.

зу з'являються поодинокі сім'яні каналці з відсутністю статевих клітин або з їх дистрофією (Рис. 2 Б). Помітних змін у стані суспензіонів та клітин Лейдига не помічено.

У 16.5-місячних щурів випадки порушення сперматогенезу в частині сім'яних каналців частішали (Рис. 2 В), з'являлися каналці зі злущеним епітелієм — безладним переміщенням структурних елементів у просвіті каналця (Рис. 2 Г).

У 17.5-місячних щурів простежуються вже випадки дуже грубого порушення структури та функції сім'яників. Нормальний процес сперматогенезу збережений не більше ніж у каналців, в останніх є ознаки повного припинення (відсутність статевих клітин) або порушення сперматогенезу (поява сім'яних шарів — характерні округлі багатоядерні маси дистрофічно змінених сперматид). Сім'яні каналці значно зменшені у розмірі, власна оболонка їх склерозована, просвіт звужено, чисельність гандулоцитів зменшена (Рис. 2 Д).

У всіх 18.5-місячних щурів спостерігали або повне пригнічення сперматогенезу, яке характеризувалося повною відсутністю статевих

клітин на тлі атрофії сім'яних каналців, або нижчу активність сперматогенезу (функціонуючих каналців було менше ніж $\frac{1}{4}$) (Рис. 2 Е). Пул гандулоцитів дуже зменшений, поданий лише дрібними клітинами, стінка кровосносних судин потовщена.

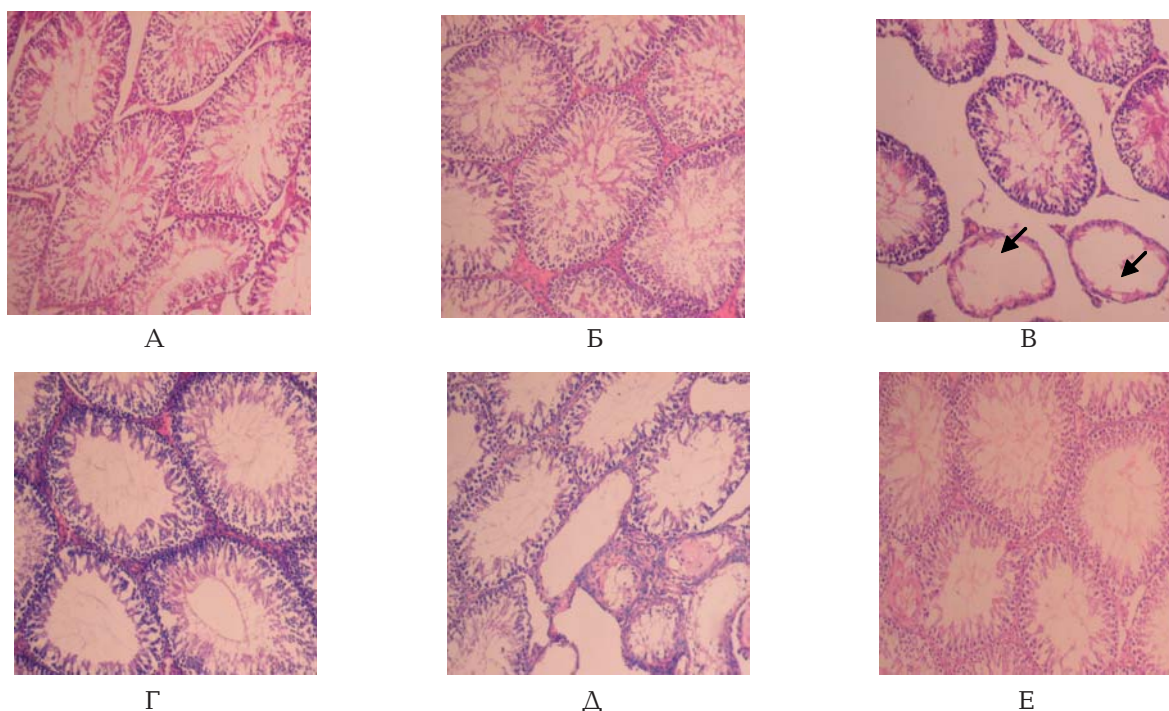
Морфоструктура сім'яників щурів, яким вводили елгацин у 12- та 15.5-місячному віці

Після першого введення елгацину змін у гістологічній структурі сім'яників у (13-15)-місячних та у переважної більшості 16.5-місячних щурів не спостерігали (Рис. 3 А-В). Стан клітин Сертолі та клітин Лейдига не змінений. В одному випадку в 16.5-місячного щура на тлі незмінених сім'яних каналців помічено появу окремих каналців з атрофією сперматогенного епітелію, злущенням клітин у просвіті (Рис. 3 В).

Морфоструктура сім'яників щурів, яким повторно вводили елгацин у 15.5-місячному віці

Повторне введення елгацину щурам у 15.5-місячному віці сприяло збереженню регенеративної функції сім'яників у 16.5-місячному віці. Стан клітин Сертолі та клітин Лейдига

Рисунок 3



Сім'яники щурів: після першого (13 (А), 15 (Б) та 16.5 (В) місяців) та другого (16.5 (Г), 17.5 (Д) та 18.5 (Е) місяців) введення елгацину (гематоксилін-еозин, $\times 150$, $\times 200$)

А-Б — нормальна гістологічна структура органу, сперматогенез представлений у повному обсязі.

В — на тлі незмінених сім'яних каналців видно поодинокі каналці з відсутніми статевими клітинами (стрілка).

Г-Д — дуже дрібний осередок порушення сперматогенезу в каналцях.

Е — незмінена будова каналців.

не змінений (Рис. 3 Г). Через один місяць після повторного введення елгацину у більшості 17.5-місячних щурів стан сперматогенезу не послаблено, гландулоцити за розміром та чисельністю не змінені, і тільки в окремих випадках спостерігали різної виразності вогнищеві порушення сперматогенної функції (Рис. 4 Д). У 18.5-місячних щурів помітні зміни у гістологічній структурі та стані сперматогенезу також були відсутні (Рис. 4 Е).

Таким чином, проведене дослідження виявило, що введення елгацину уповільнює розвиток вікових порушень процесів сперматогенезу, тривалість протекторної дії препарату зберігається протягом 2 місяців. Найбільш виразні протекторні властивості елгацину виявляються при повторному введенні щурам у зрілому пізньому віці.

Дослідження морфоструктури вентральної частки передміхурової залози інтактних щурів різного віку

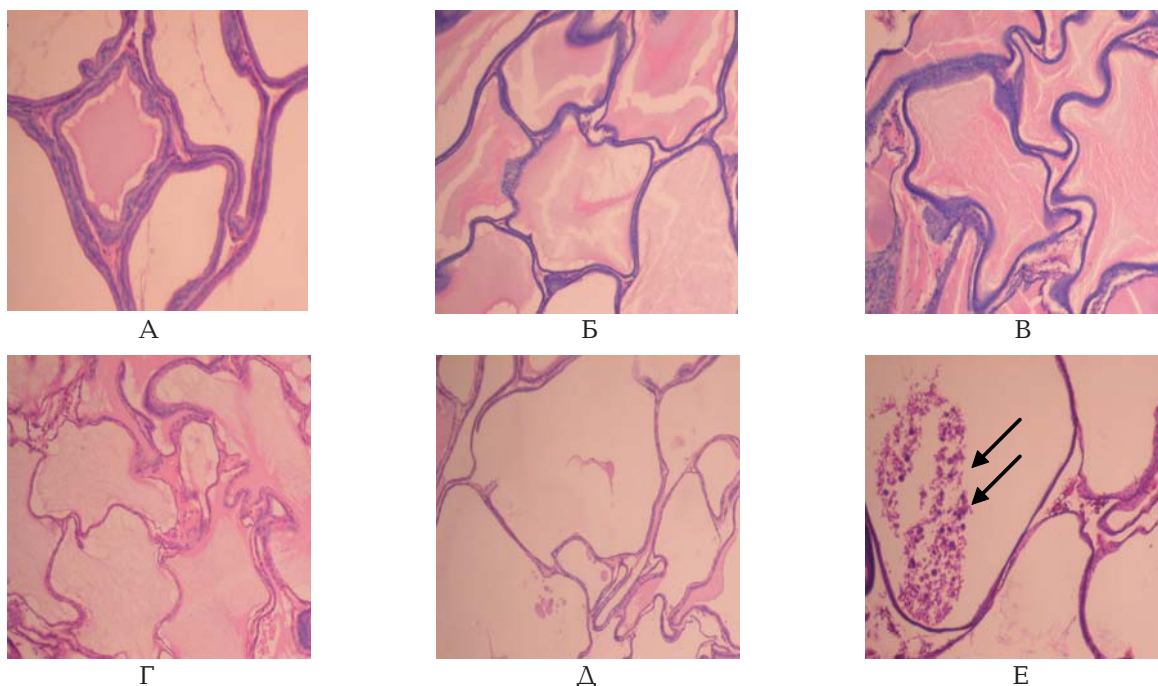
Паренхіма вентральної частки передміхурової залози у молодих щурів репродуктивного віку (6 місяців) утворена численними ацинусами простатичних залоз, досить великими за розмі-

ром, з чіткими контурами. Форма їх коливалася від округлої до витягнутої звивистої. Частина ацинусів розтягнута. Щільність розташування висока, прошарки сполучної тканини невиразні. Стінки ацинусів мали добрий тургор, утворені одним рядом переважно високої кубічної та кубічної форми епітеліальних клітин, при розтягнутому стані — низькокубічної. Просвіт ацинусів часто заповнений еозинофільним секретом (Рис. 4 А).

Стан простатичних залоз вентральної частки передміхурової залози у інтактних (13-14)-місячних щурів характеризувався виразною індивідуальністю. В одних тварин більшість ацинусів була в переважно розтягнутому стані, вони дуже щільно розташовані, форма їх сильно звивиста. Невелика частина ацинусів знаходилася у стані спадання. Епітеліальні клітини мали переважно низьку кубічну або сплюснену форму. Вищенаведені морфологічні ознаки відображають певне зниження активності та напруги функціонального стану залози. В інших тварин стан ацинусів на рівні 6-місячних тварин (Рис. 4 Б).

Починаючи з (15-16.5)-місячного віку в інтактних щурів почастишали випадки виразно-

Рисунок 4



Вентральна частка передміхурової залози 6 (А), 13 (Б), 15 (В), 16.5 (Г), 17.5 (Д) та 18.5-місячного (Е) інтактних щурів (гематоксилін-еозин, ×150)

- А — ацинуси простатичних залоз у нормі.
- Б — певне збільшення розмірів ацинусів простатичних залоз.
- В-Г — посилення звивистості контурів ацинусів простатичних залоз, стан спадання у частини з них.
- Д-Е — виразне збільшення розміру ацинусів простатичних залоз, спад стінок у частини з них, конкременти в просвіті (стрілка).

го збільшення розмірів ацинусів простатичних залоз, спостерігається звивистість їх контурів, сплюснення епітеліальних клітин. У просвіті окремих ацинусів з'явилися ознаки появи конкрементів (згустків секрету з тим чи іншим ступенем просякання мінеральними солями, Рис. 4 В, Г). Наведені вище зміни у функціональному стані простатичних залоз інтактних щурів 17.5-місячного віку наростали й у щурів 18.5-місячного віку — майже всі ацинуси знаходилися у дуже розтягнутому стані, вистелені сплюсненими епітеліальними клітинами, часто містили конкременти (Рис. 4 Д, Е).

Морфоструктура вентральної частки передміхурової залози щурів, яким вводили елгацин у 12- та 15.5-місячному віці

Під впливом елгацину у щурів (13-15)-місячного віку спостерігали менш виразні коливання ацинусів простатичних залоз за розміром та формою порівняно з інтактним контролем відповідного віку (Рис. 5 А, Б). Індивідуальність у коливанні цих показників дещо збільшилась у 16.5-місячних щурів (Рис. 5 В).

Після повторного введення елгацину стан простатичних залоз у щурів 16.5- та 17.5-місячного

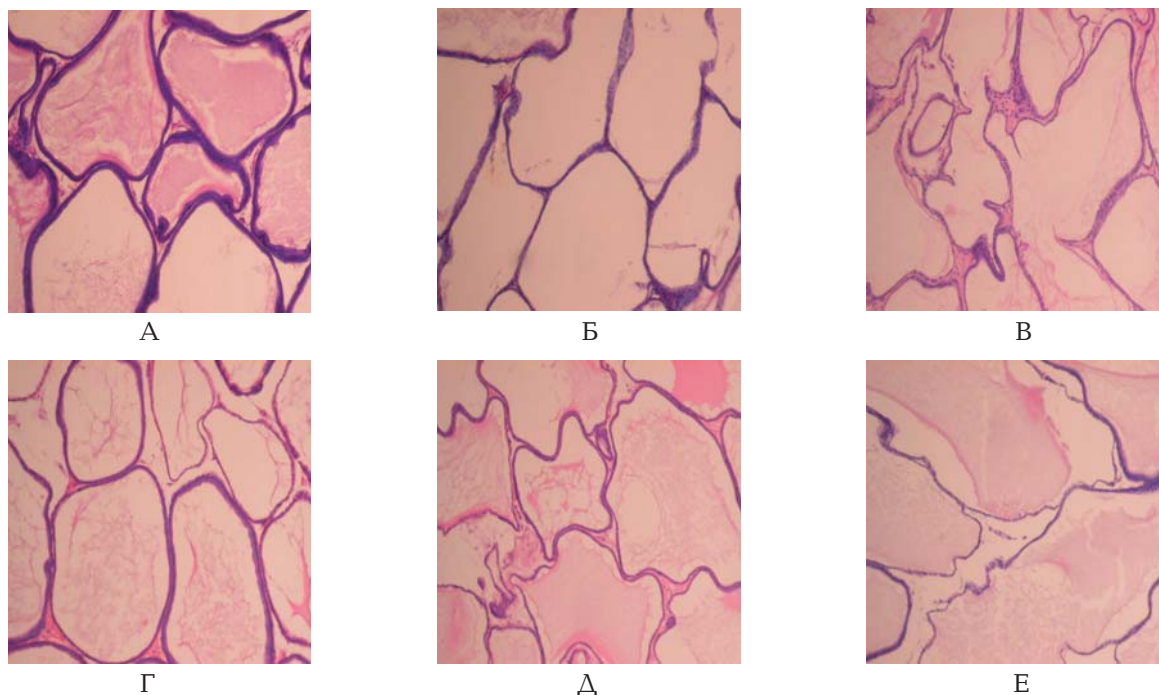
віку характеризувався відносно помірними коливаннями звивистості контурів і розмірів ацинусів та відповідною нормальною формою епітеліальних клітин (Рис. 5 Г, Д). Більш виразне коливання розміру та сплюснення епітелію простежено у 18.5-місячних щурів (Рис. 5 Е).

Таким чином, проведено дослідження дозволило простежити динаміку інволютивних процесів у сім'яниках та вентральній частці передміхурової залози в інтактних щурів 6-місячного і (13-18.5)-місячного віку.

Встановлено, що у сім'яниках вікові зміни в першу чергу позначалися на процесі сперматогенезу. Починаючи з 15-місячного віку ширина стрічки сперматогенного епітелію дещо звужувалася, що є непрямом ознакою послаблення сперматогенної функції органа, в окремих сім'яних канальцях видно деструктивні зміни або відсутність статевих клітин. З підвищенням вікового цензу частішали випадки вогнищового або дифузного припинення сперматогенезу, розвивався перитубулярний склероз.

В андрогенпродукуючих елементах сім'яників також спостерігалися зміни. Спочатку клітини Лейдига поступово ставали все менш активни-

Рисунок 5



Вентральна частка передміхурової залози щурів: після першого (13-14 (А), 15 (Б), 16.5 (В) місяців) та другого (16.5 (Г), 17.5 (Д), 18.5 (Е) місяців) введення елгацину (гематоксилін-еозин, $\times 150$)

- А — стан ацинусів простатичних залоз наближається до норми, епітеліальні клітини кубічної та низькокубічної форми.
 Б — помірне підвищення розмірів ацинусів простатичних залоз, потоншення епітеліальної висилки.
 В-Д — коливання у розмірах та звивистості контурів ацинусів простатичних залоз значно менше, ніж у інтактних щурів відповідного віку.
 Е — відсутність конкрементів в просвіті ацинусів простатичних залоз 18.5-місячних щурів.

ми (зміна середніх за розміром клітин на дрібні), потім чисельність їх дещо зменшувалася. При повному асперматогенезі гландулоцити практично атрофуються. Знайдені нами ознаки вікової інволюції сім'яників у щурів схожі на структурні зміни у стромі, епітелії та інкреторному апараті, що описані в людей при старінні [12, 13].

Приблизно з 15-місячного віку в міру старіння виявлені ознаки пригнічення функції та деструкції будови сім'яників супроводжувалися виразними змінами у паренхімі вентральної частки передміхурової залози: збільшення розмірів ацинусів простатичних залоз, сплюснення епітеліальних клітин, тобто морфологічні ознаки, які опосередковано свідчили про зниження функціональної активності секреторних одиниць та відображали компенсаторні процеси (збільшення звивистості контурів з метою підвищення площі залоз і кількості функціонуючих клітин). Також у просвіті окремих ацинусів помічено появу конкрементів, що є відомою ознакою старіння чоловічого організму [13]. Найбільш виразні зміни згасання функціональної активності простатичних залоз спостерігали в щурів 18.5-місячного віку з повним асперматогенезом.

Перше введення елгацину щурам у 12-місячному віці уповільнювало розвиток вікових порушень морфоструктури сім'яників та підтримувало активність сперматогенезу на більш високому фізіологічному рівні, ніж у відповідного вікового контролю. Тривалість цієї дії простежується навіть у більшості 16.5-місячних тварин (тобто через два місяці після закінчення введення препарату). У передміхуровій залозі цих щурів значно меншою мірою виражені ознаки зниження функціональної активності ацинусів.

Повторне введення елгацину щурам у 15.5-місячному віці також позитивно та досить виражено впливало на процес сперматогенезу протягом двох місяців спостереження. В той же час у 16.5- та 17.5-місячних щурів спостерігали деяку індивідуальність у ступені виразності цього процесу. Найбільш виражені позитивні зміни у процесі сперматогенезу спостерігали у тварин 18.5-місячного віку. Відповідно і стан гормонопродукуючих клітин у цих щурів був значно кращим, ніж у інтактних тварин відповідного віку. Функціональний стан простатичних залоз практично був на рівні такого після першого введення елгацину.

Таким чином, профілактичне введення елгацину самцям щурів у зрілому та пізньому зрілому віці уповільнює швидкість інволюційних

процесів у статевих органах – сім'яниках та простаті. Тривалість дії препарату зберігається протягом двох місяців після введення елгацину, але найбільш виразна позитивна дія спостерігається при повторному його введенні щурам у пізньому зрілому віці. Отримані дані свідчать про виразну геропротекторну дію елгацину та обґрунтовують його подальше фармакологічне вивчення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб: Наука, 2008. – Т. 2. – 434 с.
2. Hayflick L. The future of ageing / L. Hayflick // Nature. – 2000. – V. 9, № 408 (6809). – P. 267-269.
3. Анисимов В.Н. Средства профилактики ускоренного старения (геропротекторы) / В.Н. Анисимов // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. – С. 55-75.
4. Harman D. Aging: minimizing free radical damage / D. Harman // J.Anti-Aging Medicine. – 1999. – V. 2. – P.15-36.
5. Harman D. Free-radical theory of aging: increasing the functional life span / D. Harman // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1994. – Vol. 717. – P.1-15.
6. Emanuel N.M. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis / N.M. Emanuel // IARS scientific publications. – 1985. – V.58. – P.127-150.
7. Яковлева Л.В. Дослідження впливу елгацину на міокард щурів різного віку / Л.В. Яковлева, І.В. Карбушева // Фармацевтичний журнал. – 2004. – № 4. – С. 93-98.
8. Западнюк М.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / М.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
9. Директива Совета ЕС о сближении законов, постановлений и администрирование положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС) // В кн.: Надеждающая производственная практика лекарственных средств. // Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – К.: Морион. – 1999. – С. 508-545.
10. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г.Г. Автандилов. – М. Медицина, 1980. – 216 с.
11. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
12. Хэм А. Гистология: в 5 т. / А. Хэм, Д. Кормак; пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 5. – 296 с.
13. Хмельницкий О.К. Функциональная морфология эндокринной системы при атеросклерозе и старении / О.К. Хмельницкий, А.С. Ступина. – Л.: Медицина, 1989. – 248 с.

УДК 615.322:615.276:616-002:616.64

Резюме

Яковлева Л.В., Егорова А.А., Кошечкина Е.Ю., Ларьяновская Ю.Б. Национальный фармацевтический университет Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь

Влияние элгацина на возрастные изменения морфоструктуры семенников и предстательной железы крыс

Проведено изучение влияния и продолжительности действия нового антиоксидантного препарата – таблеток «Элгацин» – на возрастные изменения морфоструктуры

семенников и предстательной железы крыс. Элгацин вводили крысам двумя курсами по 30 дней ежедневно в дозе 12 мг/кг. Первый курс – в возрасте 12 месяцев, второй – в 15.5 месяцев. Гистологическое исследование тканей семенников и предстательной железы проводили сразу после окончания курса элгацина и через 1 и 2 месяца после. При старении наблюдается снижение относительной массы семенников и простаты. Меняется морфоструктура этих органов: постепенно угасают процессы сперматогенеза и снижается функциональная активность клеток Сертоли и Лейдига. В 18.5-месячном возрасте повышается процент животных с полным асперматогенезом. В просвете отдельных ацинусов простатических железок накапливаются конкременты, что является известным морфологическим признаком старения мужского организма.

Профилактическое введение элгацина самцам крыс в зрелом и позднем зрелом возрасте замедляет скорость возрастных изменений тканей семенников и простаты. Продолжительность действия препарата сохраняется в течение двух месяцев после введения, но наиболее отчетливая положительная динамика наблюдается при повторном введении крысам в позднем зрелом возрасте. Полученные данные свидетельствуют о выраженном геропротекторном действии элгацина и обосновывают целесообразность его дальнейшего фармакологического изучения.

Ключевые слова: старение, репродуктивная система, сперматогенез, семенники, предстательная железа, антиоксиданты, элгацин.

UDC 615.322:615.276:616-002:616.64

Summary

Yakovleva L., Egorova E., Koshevaya E., Laryanovskaya I. National University of Pharmacy, Kharkov
Crimea State Medical University named after S.I. Georgievsky

Effect of elgacin on age-related morphostructural changes in testes and prostate in rats

The effect of new antioxidant tablets «Elgacin» on age-related morphostructural changes in testes and prostate was studied.

Elgacin was administered to rats daily at a dose of 12 mg/kg during two courses of 30 days each. The first course was started at the animal age of 12 months, the second – 15.5 months.

Histological examination of testes and prostate tissues was performed immediately after the course of treatment with elgacin and then one and two months later. A decrease of testes and prostate relative weights was noticed with animal aging. There were also morphostructural changes: gradually fading processes of spermatogenesis and decreased functional activity of Leydig and Sertoli cells. At the age of 18.5 months we observed an increased number of animals with complete aspermatogenesis. In the lumen of some prostatic acini accumulation of concretions were seen. All these findings indicated aging of male organism.

Prophylactic administration of elgacin to adult and late-adult rats decelerated age-related changes in the testis and prostate tissues. The duration of drug effect was seen during next two months after the treatment, but the most efficient positive changes were detected in rats after the second repeated drug administration in late adulthood.

These findings indicate a pronounced geroprotective action of elgacin and prove reasonability of its further pharmacological studies.

Keywords: aging, reproductive system, spermatogenesis, testis, prostate, antioxidants, elgacin.

Яковлева Лариса Васильевна. Д.фарм.н., профессор, зав. кафедры фармакоэкономики НФаУ.

Егорова Елена Александрівна. Асистент кафедри клінічної фармакології та фармакотерапії Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського.

Кошова Елена Юрійвна. К.фарм.н., ст. наук. співроб. центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ.

Ларьяновська Юлія Борисівна. К.б.н., ст. наук. співроб. центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ.

Фармако-економічні та маркетингові дослідження

УДК 615.1:167/168:351.84:615.12:338.5

Панфілова Г.Л., Цурікова О.В.
Національний фармацевтичний університет**Аналіз нормативно-правових та фармакотерапевтичних підходів у формуванні державних закупівель лікарських засобів для хворих на гемобластози в Україні**

У статті наведені результати досліджень складу тендерних закупівель лікарських засобів, що здійснювалися протягом 2010-2013 рр. для хворих на гемобластози, за фармакотерапевтичними групами та їх відповідності вимогам Зразкового (модельного) переліку лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я 18-ї редакції (квітень 2013 р.), а також нормам діючої нормативно-правової бази, яка регулює питання обігу препаратів в Україні та в Російській Федерації. Вставлено, що за якісним складом найменувань препаратів за МНН тендерні закупівлі лікарських засобів значно більше відповідали вимогам російської нормативно-правової бази (Перелік життєво необхідних та найважливіших лікарських препаратів та Перелік лікарських засобів, що мають стратегічне значення), ніж діючому в Україні Національному переліку основних лікарських засобів і виробів медичного призначення. У структурі закупівель лікарських засобів домінуючі позиції як за кількістю асортиментних позицій, так і вартістю їх придбання займали препарати з групи L01 «Антинеопластичні препарати». На придбання препаратів, що використовуються у симптоматичному лікуванні гемобластозів, витрачалися незначні за обсягом кошти, а закупівлі мали нерегулярний характер. За результатами проведених досліджень окреслені основні напрямки підвищення ефективності фармацевтичного забезпечення онкогематологічних хворих в Україні.

Ключові слова: гемобластоз, державна цільова програма, тендерна закупівля препаратів, онкогематологічні хворі.

За офіційними даними Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України обсяги державного фінансування цільових програм та комплексних заходів програмного характеру збільшуються з кожним роком. У 2013 р. на виконання державних гарантій з організації надання медичної та фармацевтичної допомоги онкологічним хворим з державного бюджету було витрачено 510 835.5 тис. грн (в т. ч. на лікування онкохворих дітей — 215 961.9 тис. грн), що у 1.6 разів вище, ніж за даними попереднього 2012 року [1, 2]. Проте, за оцінкою фахівців, представників громадських та благодійних організацій, рівень фармацевтичного забезпечення онкологічних хворих в Україні не відповідає реальній потребі пацієнтів у високоефективних лікарських засобах (ЛЗ), вартість яких, у свою чергу, має компенсуватись за державні кошти [2, 3]. Високий рівень смертності хворих на гемобластози (ГБ), особливо у дитячому віці, та тяжкість розвитку патологічного процесу обумовлюють особливе соціально-економічне та медико-етичне значення досліджень з розробки та впровадження моделей раціонального використання державних коштів при здійсненні тендерних закупівель ЛЗ для задоволення потреб вітчизняної онкогематологічної служби. Важливим етапом у проведенні досліджень з означеного кола питань є аналіз державних закупівель ЛЗ за різними параметрами з метою визначення основних проблем у фармацевтичному забезпеченні хворих на ГБ та розробка напрямків їх

вирішення. Останнім часом у науковій літературі досить багато уваги приділяється розгляду питань оптимізації державних закупівель, що здійснюються у сфері охорони здоров'я [5-7, 9, 12, 13, 16]. Проте аналіз складу тендерних закупівель ЛЗ, що здійснювалися для хворих на ГБ, у розрізі фармакотерапевтичних груп, а також на відповідність діючим в Україні та світі відповідним законодавчо-нормативним та правовим актам не проводився. Представлена робота є продовженням комплексних досліджень, що проводяться вже декілька років науковцями за різними напрямками на кафедрах організації та економіки фармації (проф. Немченко А.С.) та менеджменту та маркетингу у фармації (проф. Мнушко З.М.) Національного фармацевтичного університету.

Мета роботи полягала у вивченні нормативно-правових і фармакотерапевтичних підходів, на основі яких здійснювалися тендерні закупівлі ЛЗ для хворих на ГБ в Україні протягом 2010-2013 рр., у визначенні основних проблем у фармацевтичному забезпеченні вітчизняної онкогематологічної служби та окресленні напрямків їх вирішення. Для досягнення вказаної мети необхідно було вирішити такі завдання: проаналізувати склад тендерних закупівель ЛЗ у динаміці років на відповідність вимогам Зразкового (модельного) переліку ЛЗ Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) та комплексу нормативно-правових актів, що регулюють питання обігу ЛЗ в Україні та у Ро-

сійській Федерації (РФ); провести структурний аналіз тендерних закупівель за фармако-терапевтичними групами за різними рівнями АТС-класифікаційної системи у загальній сумі закупівель ЛЗ; за результатами проведених досліджень окреслити коло проблемних питань в організації фармацевтичного забезпечення хворих на ГБ та визначити основні напрямки їх вирішення. Об'єктами дослідження були обрані дані річних планів, реєстрів державних закупівель ЛЗ, що представлені на офіційному сайті МОЗ України у рубриці «Централізована закупівля і постачання» [4, 18, 19].

Під час проведення досліджень використовувалися редакції нормативно-правових актів, що за терміном дії співпадали з датами проведення тендерних закупівель ЛЗ. Так, аналізувався склад Зразкового (модельного) переліку ЛЗ ВООЗ 16, 17 та 18-ї редакцій (Перелік ЛЗ ВООЗ), Національного переліку основних лікарських засобів (ОЛЗ) і виробів медичного призначення (ВМП) (постанова Кабінету Міністрів України (КМУ) від 25.03.2009 р. № 333), так званого «бюджетного переліку ЛЗ» (постанова КМУ від 05.09.1996 р. № 1071 зі змінами та доповненнями), Державного формуляра ЛЗ 2, 3, 4 та 5-го випусків (Накази МОЗ України від 28.01.2010 р. № 59, від 23.03.2011 р. № 159, від 28.03.12 р. № 209, 29.03.2013 р. відповідно), а та-

кож клінічних протоколів, що затверджені за спеціальністю «Гематологія» та «Дитяча гематологія» [1, 10, 11, 14, 15]. У Переліках ЛЗ ВООЗ були переглянуті пункти 6.2. «Антибактеріальні засоби», 6.3. «Противірикові засоби», 8.1. «Імуносупресори», 8.2. «Цитотоксичні та ад'ювантні препарати», 10.3. «Інші препарати для лікування гемоглобінопатії». Для порівняльного аналізу використовувався також Перелік життєво необхідних та найважливіших лікарських препаратів (ЛП) (розпорядження Уряду РФ від 07.12.2011 № 2199-р) та Перелік ЛЗ, що мають стратегічне значення (розпорядження Уряду РФ від 06.07.2010 № 1141-р), що діють у РФ [20]. Вибір нормативно-правових документів, які регулюють питання обігу ЛЗ у РФ, обґрунтований на підставі таких тверджень. У РФ з 1991 р. діє соціальна модель обов'язкового медичного страхування (ОМС), яка кардинально змінила не лише фінансово-економічні підходи до діяльності закладів охорони здоров'я, а й методи державного регулювання в організації медичного та фармацевтичного забезпечення населення країни. За даними публікацій, що представлені на офіційному сайті МОЗ, в Україні планується впровадження ОМС вже у 2015 р. Крім цього, внаслідок спільного, протягом декількох десятиріч, соціально-економічного розвитку в складі колишнього СРСР та незважаю-

Таблиця 1

Аналіз складу тендерних закупівель ЛЗ з онкогематології відповідно до вимог міжнародної та вітчизняної нормативно-правової бази

Наявність препаратів (кількість ЛЗ за МНН та питома вага) у нормативно-правових актах за роками дослідження			
2010	2011	2012	2013
Зразковий (модельний) перелік ЛЗ ВООЗ відповідної рокам закупівель ЛЗ редакції			
20 (45.5 %)	17 (50 %)	16 (44.4 %)	19 (41.3 %)
Національний перелік ОЛЗ і ВМП (постанова КМУ від 25.03.2009 р. № 333)			
19 (43.2 %)	15 (44.1 %)	14 (38.9 %)	15 (32.6 %)
Бюджетний перелік ЛЗ (постанова КМУ від 05.09.1996 р. № 1071 зі змінами та доповненнями, внесеними відповідними наказами МОЗ України)			
44 (100 %)	34 (100 %)	36 (100 %)	46 (100 %)
Державний формуляр ЛЗ відповідної рокам закупівель ЛЗ редакції			
44 (100 %)	34 (100 %)	35 (97.2 %)	44 (95.7 %)
Перелік життєво необхідних та найважливіших ЛП (розпорядження Уряду РФ від 07.12.2011 р. № 2199-р, відповідно до розпорядження № 1378-р від 30.07.2012 р., у 2013 р. перелік залишився незмінним)			
38 (86.4 %)	29 (85.3 %)	30 (83.3 %)	34 (73.9 %)
Перелік ЛЗ, що мають стратегічне значення (розпорядження Уряду РФ від 06.07.2010 р. № 1141-р)			
27 (61.4 %)	23 (67.7 %)	25 (69.4 %)	23 (50 %)
Загальна кількість асортиментних позицій ЛЗ за МНН, що закуплені за тендерами			
44 (100 %)	34 (100 %)	36 (100 %)	46 (100 %)

чи на наявність якісних відмінностей у процесі державотворення, сучасним системам охорони здоров'я в Україні та РФ притаманно багато спільних проблем. Наприклад, нецільове використання бюджетних коштів, відсутність матеріальної зацікавленості медичних і фармацевтичних працівників у результатах своєї роботи, надмірна комерціалізація фармацевтичного ринку та недосконалі механізми регулювання його розвитку, тощо. Тому результати аналізу складу тендерних закупівель ЛЗ на відповідність нормативно-правовій базі, що діє в РФ, мають певне практичне значення за умов перспектив впровадження соціальної моделі ОМС в Україні.

При проведенні досліджень були використані логічний, системно-аналітичний, математико-статистичний та порівняльний методи аналізу. Для наочного подання результатів проведених досліджень застосовувався графічний метод, а обробка статистичних даних здійснювалась за допомогою комп'ютерних програм (STATISTICA, V.6; Microsoft Office Excel 2007) та з використанням стандартних методик варіаційної статистики [17].

За результатами аналізу складу тендерних закупівель ЛЗ на відповідність вимогам Переліку ЛЗ ВООЗ, Національного переліку ОЛЗ і ВМП, Бюджетному переліку ЛЗ та вимогам переліків, що регулюють обіг ЛЗ в РФ (Перелік життєво необхідних та найважливіших ЛП, Перелік ЛЗ, що мають стратегічне значення) встановлено таке (Табл. 1). У складі тендерних закупівель ЛЗ за різними роками досліджень були присутні від 16 (2012 р.) до 20 (2010 р.) найменувань ЛЗ, які представлені у складі Переліку ЛЗ ВООЗ та від 14 (2012 р.) до 19 (2010 р.) препаратів з Національного переліку ОЛЗ і ВМП. З 2012 р. спостерігається планомірне зниження питомої ваги ЛЗ, придбаних для хворих на ГБ за державні кошти, які входять до складу Переліку ЛЗ ВООЗ (з 50 % до 41.3 %) та Національного переліку ОЛЗ і ВМП (з 44.1 % до 32.6 %).

Найнижче значення питомої ваги препаратів з Переліку ЛЗ ВООЗ у складі закупівель спостерігалось у 2013 р. (41.3 %), а найвище – у 2011 р. (50 %). У свою чергу, аналогічні показники за даними порівняння зі складом Національного ОЛЗ і ВМП становили 32.6 % (2013 р.) та 44.1 % (2011 р.). Цікавим, на нашу думку, є той факт, що склад закупівель ЛЗ більшою мірою, порівняно з Національним переліком ОЛЗ і ВМП, відповідає вимогам Переліку життєво необхідних та найважливіших ЛП, який діє у РФ. Зазначений перелік ЛЗ є нормативно-правовим аналогом Національного переліку ОЛЗ і ВМП.

Зазначені переліки розроблялись та впроваджувались у національних системах охорони здоров'я для реалізації єдиної мети. Так, відповідно до розробленої ВООЗ концепції ОЛЗ, до життєво необхідних та найважливіших ЛЗ належать препарати, які відповідають пріоритетним потребам медичного обслуговування населення та визначаються з урахуванням значущості для суспільної охорони здоров'я, доказів ефективності та порівняльної економічної ефективності. Враховуючи структуру вже діючих стандартів надання медичної допомоги та тих, що формуються по онкогематології (2012 р.), у РФ, окрім іматинібу, додатково до складу вищезазначеного переліку ЛЗ були включені протипухлинні препарати дазатиніб та нілотиніб [20]. Зазначені препарати використовуються у лікуванні хронічного мієлолейкозу, а також гострого лімфоїдного лейкозу з позитивною філадельфійською хромосомою [7, 10, 11]. У складі Національного переліку ОЛЗ і ВМП зазначені препарати відсутні. Як бачимо за даними Табл. 1, тендерні закупівлі за різними роками досліджень містили у своєму складі від 73.9 % (2013 р.) до 86.45 % (2010 р.) найменувань ЛЗ, що представлені у російському Переліку життєво необхідних та найважливіших ЛП. Аналогічна за характером тенденція спостерігалася за результатами співставлення змісту тендерних закупівель ЛЗ та Переліку ЛЗ, що мають стратегічне значення. У РФ зазначений перелік ЛЗ розроблявся з метою підвищення економічної доступності ЛЗ, які застосовуються в лікуванні найбільш поширених захворювань та виробництво яких має стратегічне значення для країни (всього 57 найменувань препаратів). Так, встановлено, що склад тендерних закупівель ЛЗ у значно ширшому діапазоні найменувань відповідає змісту російського Переліку ЛЗ, що мають стратегічне значення (від 50 % у 2013 р. до 69.4 % у 2012 р.), ніж змісту діючого в Україні Національного переліку ОЛЗ і ВМП (від 32.6 % за даними 2013 р. до 44.1 % у 2011 р.).

Основною метою розробки, впровадження та постійного перегляду Бюджетного переліку ЛЗ є забезпечення ефективного використання бюджетних коштів і підтримка вітчизняного виробника у фармацевтичній галузі. За результатами аналізу встановлено, що за всіма роками дослідження склад тендерних закупівель ЛЗ на 100 % за асортиментними позиціями відповідав вимогам зазначеного нормативного акта. Тобто можна констатувати про повну відповідність закупівель ЛЗ нормі діючого законодавства, яке закріплене у постанові КМУ від 05.09.1996 р. № 1071 зі змінами та доповненнями [14].

За результатами співставлення даних закупівель з вимогами Державного формуляра ЛЗ різних редакцій встановлено таке. У повному складі ЛЗ, що закуповувалися за державні кошти у 2010 та 2011 рр., були представлені у Державному формулярі ЛЗ за розділами «Гематологія», «Лікарські засоби для лікування онкологічних новоутворень», «Імуномодулятори та протиалергічні засоби», «Протимікробні засоби та антигельмінтні засоби». У 2012 р. для потреб онкогематологічної служби був придбаний пегфілграстим 50 мг, який відсутній за МНН у складі Державного формуляра ЛЗ 4-го випуску. Пегфілграстим належить до групи L03AA «Колонієстимулюючі фактори» та є ковалентним кон'югантом філграстиму (рекомбінантний людський гранулоцитарний колонієстимулюючий

фактор) [1]. На фармацевтичному ринку України пегфілграстим представлений під торговою назвою «Неуластим» компанії «Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцарія. Цікавим є той факт, що препарат «Неуластим» представлений у Державному формулярі ЛЗ 4-го випуску в переліку торгових найменувань філграстиму. За даними 2013 р. у складі закупівель ЛЗ були представлені лише два препарати, які відсутні у Державному формулярі ЛЗ 5-го випуску (пегфілграстим та ломустин). У Табл. 2 представлені результати аналізу динаміки кількості ЛЗ (МНН препаратів з урахуванням одиниці дозування) та суми їх закупівель за фармакотерапевтичними групами. Логічним виглядає значне домінування за кількістю придбаних асортиментних позицій та сумою закупівлі препаратів з групи L01

Таблиця 2

Структурний аналіз тендерних закупівель ЛЗ для хворих на ГБ за державною цільовою програмою «Онкологія» за 2010-2013 рр.

Склад закупівель за фармакотерапевтичними групами ЛЗ за III рівнем АТС-класифікаційної системи							
2010 р.		2011 р.		2012 р.		2013 р.	
N*	сума, тис. грн	N*	сума, тис. грн	N*	сума, тис. грн	N*	сума, тис. грн
B03A – Препарати заліза							
2	2248.8	–	–	1	944.6	1	734.6
L01A – Алкілюючі сполуки							
8	2626.2	5	1828.0	4	997.4	7	9338.4
L01B – Антиметаболіти							
10	6475.4	4	8457.8	5	4431.3	7	8480.1
L01C – Алкалоїди рослинного походження та інші препарати природного походження							
3	1324.6	3	1437.1	3	1571.7	1	901.6
L01D – Цитотоксичні антибіотики та споріднені препарати							
6	3580.4	5	3915.0	6	3126.4	5	2722.2
L01X – Інші антинеопластичні засоби							
10	40199.1	9	42759.8	9	50146.8	9	94422.9
L03A – Імуностимулятори							
2	3734.1	2	4884.4	3	5153.8	4	9002.3
L04A – Імуносупресанти							
1	15.0	2	687.8	2	587.5	1	673.3
J01C – Бета-лактамі антибіотики, пеніциліни							
–	–	–	–	–	–	1	264.8
J01D – Інші бета-лактамі антибіотики							
–	–	–	–	1	1129.6	3	2379.0
J02A – Протигрибкові засоби для системного застосування							
–	–	2	349.4	–	–	4	3294.2
M05B – Засоби, які впливають на структуру та мінералізацію кісток							
1	1795.0	2	1232.7	2	1129.5	1	933.0
V03 AF – Засоби, що використовуються для усунення токсичних ефектів протипухлинної терапії							
1	20.2	–	–	–	–	2	83.8
Всього за групами ЛЗ							
44	62018.8	34	65552.0	36	69218.6	46	133230.2

Примітка: * – кількість асортиментних позицій ЛЗ за МНН з урахуванням одиниці дозування препаратів.

«Антинеопластичні препарати». За різні роки дослідження питома вага препаратів із зазначеної групи у загальній кількості придбаних для онкогематологічних хворих ЛЗ коливалась у діапазоні від 63 % (2013 р.) до 84.1 % (2010 р.), а за вартісними показниками від 87 % (2013 р.) до 89.1 % (2011 р.).

Слід зазначити, що протягом 2010-2013 рр. спостерігався досить стабільний характер складу фармакотерапевтичних груп-лідерів за вартістю закуплених ЛЗ. Першу позицію за вартістю закуплених ЛЗ протягом 2010-2013 рр. стабільно займали препарати з групи L01X «Інші антинеопластичні препарати». Так, питома вага вартості препаратів з групи L01X коливалась у діапазоні від 64.8 % (2010 р.) до 72.5 % (2012 р.). У 2010 та 2011 рр. другу позицію займали препарати з групи L01B «Антиметаболіти» (10.4 % та 12.9 % за роками відповідно), а третю — L03A «Імуностимулятори» (6 % та 7.45 %). За даними 2012 р. зазначені групи помінялися місцями у рейтингу. Так, друге місце за вартістю придбання займали препарати з групи L03A «Імуностимулятори» (7.5 %), а третє — L01B «Антиметаболіти» (6.4 %). У 2013 р. друге місце зайняли ЛЗ, що належали до групи L01A «Алкілюючі сполуки» (7.0 %), а третє — L03A «Імуностимулятори» (6.8 %). Як бачимо, у структурі державних закупівель ЛЗ спостерігається безумовне домінування ЛЗ (кількість асортиментних позицій, вартість їх придбання), які застосовуються у патогенетичному лікуванні ГБ та входять до складу схем поліхіміотерапії (ПХ). Препарати, що використовуються у симптоматичному лікуванні ГБ, були представлені у державних закупівлях або фрагментарно, або на їх придбання витрачались незначні кошти. Це ЛЗ, що належать до таких груп, як V03A «Препарати заліза» (питома вага у сумі закупівель коливалась у діапазоні від 0.6 % до 3.6 %), J01C «Бета-лактамі антибіотики, пеніциліни» (0.2 %), J02A «Противірусні засоби для системного застосування» (0.5-2.5 %), J01D «Інші бета-лактамі антибіотики» (1.6-1.8 %), M05B «Засоби, які впливають на структуру та мінералізацію кісток» (0.7-2.9 %) та V03 AF «Засоби, що використовуються для усунення токсичних ефектів протипухлинної терапії» (< 0.1 %).

Констатуємо результати проведених досліджень, можна зазначити таке. Вирішення проблем у фармацевтичному забезпеченні хворих на ГБ потрібно розглядати у двовекторному напрямку, а саме у впровадженні соціальної моделі ОМС та розробці й реалізації спеціалізованої до потреб онкогематологічних хворих в Україні державної цільової програми «Гема-

тологія». Ефективна реалізація організаційно-економічних та соціальних принципів, які покладені в основу ОМС, дозволить формувати раціональну витратну політику в системі охорони здоров'я за умов обмеженого характеру державного фінансування цільових програм та зростаючої кількості онкогематологічних хворих в Україні.

Висновки

За результатами досліджень встановлено, що склад тендерних закупівель ЛЗ, які здійснювалися для хворих на ГБ за державною цільовою програмою «Онкологія» протягом 2010-2013 рр., за кількістю найменувань відповідав Переліку ЛЗ ВООЗ на 41.3 % (2013 р.) — 50 % (2011 р.).

Доведено, що тендерні закупівлі ЛЗ за якісним складом найменувань препаратів більшою мірою відповідали вимогам російської нормативно-правової бази (Перелік життєво необхідних та найважливіших ЛП та Перелік ЛЗ, що мають стратегічне значення), ніж діючому в Україні Національному переліку ОЛЗ і ВМП.

Результати аналізу тендерних закупівель ЛЗ для хворих на ГБ, діючих в Україні клінічних протоколів (спеціальність «Гематологія», «Дитяча гематологія»), а також сучасних тенденцій у тактиці лікування онкогематологічних хворих дають змогу стверджувати про необхідність внесення змін до Національного переліку ОЛЗ і ВМП за такими позиціями, як імаїніб, дазатиніб та нілотиніб.

Доведено, що склад тендерних закупівель ЛЗ за асортиментними позиціями препаратів за МНН за всіма роками дослідження на 100 % відповідав вимогам Бюджетного переліку ЛЗ.

За даними співставлення складу закупівель ЛЗ та Державного формуляра різних випусків встановлено, що всі найменування ЛЗ, що закуповувалися у 2010 та 2011 рр., були представлені у складі Державного формуляра ЛЗ. У 2012 р. за державні кошти було придбано лише одне найменування ЛЗ (пегфілграстим), а у 2013 р. — два препарати (пегфілграстим, ломустин), які відсутні у складі Державного формуляра ЛЗ відповідного рокам закупівель випуску.

У структурі тендерних закупівель ЛЗ як за кількістю асортиментних позицій, так і сумою на їх придбання встановлено значне домінування препаратів з групи L01 «Антинеопластичні препарати».

За питомою вагою придбаних ЛЗ у загальній сумі закупівель доведений стабільний характер складу фармакотерапевтичних груп-лідерів (I-III місця). Так, першу позицію за вар-

тістю закупівлі протягом 2010-2013 рр. займали препарати з групи L01X «Інші антинеопластичні засоби». Другу та третю позиції за різними роками дослідження займали препарати з груп L01A «Алкілюючі сполуки», L01B «Антиметаболіти», L03A «Імуностимулятори».

Встановлено, що препарати, які використовуються у симптоматичному лікуванні ГБ, закуповувалися нерегулярно, а питома вага вартості їх придбання у загальній сумі закупівель ЛЗ коливалась у незначному діапазоні значень (від < 0.1 % до 2.5 %).

ЛІТЕРАТУРА

1. Архів наказів про затвердження Державного формуляра лікарських засобів [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.dec.gov.ua/index.php/arkhiv-nakaziv-pro-zatverdzhennya-derzhavnogo-formulyara-likarskikh-zasobiv>.
2. Бугайова О. Лікування гемобластозів в Україні. Погляд фахівця / О. Бугайова // Здоров'я України. — 2009. — № 1/1. — С. 30-31.
3. Бюджетні призначення на 2013 рік по бюджетній програмі за КПКВК 2301400 «Забезпечення медичних заходів окремих державних програм та комплексних заходів програмного характеру» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/pre_20130205_4.html.
4. Державні закупівлі МОЗ України [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/mtsp_plansofpurchases/?CID=73&_pg=4&_cnt=30&_sort=dPublicate_raw&_order=-1.
5. Свтушенко О.М. Моделювання вибору бюджетної організації-споживача лікарських засобів з використанням оцінки ризику / О.М. Свтушенко // Фармацевтичний журнал. — 2008. — № 6. — С. 21 — 27.
6. Карнаух М. Державні закупівлі ліків [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://amm.net.ua/2011-09-07-07-06-55.html>.
7. Косяченко К.Л. Науково-методичні підходи до проведення моніторингу цін на лікарські засоби, що закуповуються за державними цільовими програмами // К.Л. Косяченко, А.С. Немченко, О.В. Коваленко // Фармацевтичний журнал. — 2011. — № 1. — С. 13 — 18.
8. «МОЗ тримає на контролі цільове використання лікарських засобів, що закуповуються за державні кошти» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.kmu.gov.ua/control/uk/publish/article?art_id=246489422&cat_id=244277212.
9. Мнушко З.М. Визначення економічної доступності лікарських препаратів, що закуповуються за державні кошти / З.М. Мнушко, Н.В. Шолойко // Інформаційний лист. — Харків: Вид-во НФаУ, 2008. — 6 с.
10. Наказ МОЗ № 364 від 20.07.2005 р «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «Дитяча гематологія» зі змінами, внесеними згідно з Наказом МОЗ від 23.07.2010 р. № 617 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/en/portal/dn_20050720_364.htm.
11. Наказ МОЗ України від 30.07.2010 р. № 647 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги хворим зі спеціальності «Гематологія» зі змінами, внесеними згідно з Наказом МОЗ від 30.01.2013 р. №72 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20100730_647.html.
12. Немченко А.С. Дослідження стану організації фармацевтичної допомоги хворим за державними цільовими програмами «Туберкульоз», «СНІД», «Онкологія» та «Дитяча онкологія» / А.С. Немченко, Г.Л. Панфілова, Ю.В. Корж // Управління, економіка та забезпечення якості в фармацевті. — 2009. — № 3 (5). — С. 65-71.
13. Немченко А.С. Методика проведення клініко-економічного аналізу тендерних закупівель ЛЗ за державними цільовими програмами: метод. рек. / А.С Немченко, К.Л. Косяченко, Г.Л. Панфілова. — Харків: НФаУ, 2011. — 26 с.
14. Постанова Кабінету Міністрів України від 5.09.1996 р. № 1071 «Про порядок закупівлі лікарських засобів закладами та установами охорони здоров'я, що фінансуються з бюджету» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/64839>.
15. Постанова Кабінету Міністрів України від 25.03.2009 р. № 333 «Деякі питання державного регулювання цін на лікарські засоби і виробу медичного призначення [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.ua-tenders.com/legislation/decisions/p333>.
16. Левицька О.Р. Раціоналізація використання бюджетних коштів, призначених для закупівлі лікарських засобів / О.Р. Левицька, О.Б. Борецька, М.М. Засць // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація. — 2010. — № 3-4. — С. 127-133.
17. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. — М.: Медиафера, 2003. — С. 208 — 216.
18. Реєстр держзакупівель МОЗ [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/43237>.
19. Річний план держзакупівель МОЗ [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/portal/tend_20100802_0.html.
20. «Утвержден перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2012 г.» (название с экрана) [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://cml-stop.ru/viewtopic.php?id=227>.

УДК 615.1:167:168:351.84:615.12:338.5

Резюме

Панфилова А.Л., Цурикова О.В.

Национальный фармацевтический университет

Анализ нормативно-правовых и фармакотерапевтических подходов в формировании государственных закупок лекарственных средств для больных гемобластомами в Украине

В статье представлены результаты исследований состава тендерных закупок лекарственных средств, которые осуществлялись в течение 2010-2013 гг. для больных гемобластомами, по фармакотерапевтическим группам и их соответствия требованиям Образцового (модельного) перечня лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения 18-й редакции (апрель 2013 г.), а также норм действующей нормативно-правовой базы, регулирующей обращение препаратов в Украине и в Российской Федерации. Установлено, что по качественному составу наименований препаратов по МНН тендерные закупки ЛС в большей степени отвечали требованиям российской нормативно-правовой базы (Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и Перечень стратегически значимых лекарственных средств), чем действующему в Украине Национальному перечню основных лекарственных средств и изделий медицинского назначения. В структуре закупок лекарственных средств доминирующие позиции как по количеству ассортиментных позиций, так и по стоимости их приобретения занимали препараты из группы L01 «Антинеопластические препараты». На приобретение препаратов, которые используются в симптоматическом лечении гемобластозов, были затрачены небольшие средства, а сами закупки имели нерегулярный характер. В результате проведенных исследований обозначены основные направления повышения

ефективності фармацевтичного забезпечення онкогематологічних хворих в Україні.

Ключевые слова: гемобластоз, государственная целевая программа, тендерная закупка препаратов, онкогематологические больные.

UDC 615.1:167/168:351.84:615.12:338.5

Summary

Panfilova A.L., Tsurikova O.V.

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Analysis of the legal and regulatory pharmacotherapeutic approaches in the formation of public procurement of medicines for patients with hematological malignancies in Ukraine

The article presents the results of studies of drug procurement tenders, which were carried out during the years 2010-2013 for patients with hematological malignancies by pharmacotherapeutic groups and by meeting the requirements of the Model list of drugs recommended by WHO 18th edition (April 2013), as well as the standards of regulatory and legal framework regulating the circulation of drugs in Ukraine and Russia. It was found that the qualitative composition of medicines names (by INN) purchased on tenders are more compatible to requirements of the Russian legal base (List of Essential drugs and the list of drugs that are of strategic importance) than to the Ukrainian equivalent – National list of main drugs and medical devices. As a result of our research it is recommended to put changes concerning such drugs as imatinib, dasatinib

and nilotinib into the National list of main drugs and medical devices. It was found that the composition of tender procurement of drugs met the requirements of the Budget of the list of drugs to 100%. In the structure of drug procurement dominant position, both for the number of assortment positions and for the cost of acquisition belongs to the drugs from the group L01 «Antineoplastic drugs». Little money has been spent on the purchase of drugs, which are used in the symptomatic treatment of hematological malignancies and the purchases themselves were irregular. The studies identified the main directions of the efficiency improvement of pharmaceutical care for cancer patients in Ukraine. The results of these studies provide an opportunity to argue about the need to develop and implement the state target program «Hematology». The most important condition for the effective implementation of this program are the introduction of social model of compulsory health insurance of evidence-based model which provides pharmaceutical care to oncohematological patients according to their actual needs in various names of drugs, as well as the financial capacity of the national health system.

Keywords: hemoblastosis, state target program, tender purchase of drugs, oncohematological patients.

Панфілова Ганна Леонідівна. Д.фарм.н., доцент кафедри організації та економіки фармації НФаУ.

Цурікова Оксана Володимирівна. Здобувач кафедри організації та економіки фармації НФаУ.

До відома авторів журналу «Фармаком»

Для публікації на сторінках нашого журналу автори мають дотримуватися таких вимог:

1. Стаття повинна мати такі необхідні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими або практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми та на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким і присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням одержаних наукових результатів; висновки з даного дослідження та перспективи подальших розвідок у даному напрямку.
2. Стаття має бути надрукована на папері формату А4 через 2 інтервали з полями 2.5 см з усіх боків, 28-30 рядків на сторінці, 60-65 знаків у рядку, розмір шрифту 14, шрифт Times New Roman або Arial. Загальний обсяг статті не має перевищувати 15 сторінок (без урахування резюме).
3. Робота подається українською мовою (для авторів, що проживають за межами України, можливо російською) у 2-х примірниках, підписаних усіма авторами.
4. Прізвище(а) автора(ів) слід зазначити на першій сторінці, далі навести назву організації або установи, де працює(ють) автор(и) та назву статті, також мають бути зазначені рубрики УДК.
5. Матеріали до публікації обов'язково мають включати резюме (російською, українською та англійською мовами (резюме англійською мовою надається обсягом не менше 1 сторінки формату А4)) та відомості про кожного з авторів із зазначенням прізвища, ім'я та по батькові, наукового звання (посади) (із зазначенням року), наукового ступеня (із зазначенням року), місця роботи, службового та домашнього телефонів.
6. До статті мають бути прикладені супровідний лист та експертний висновок про можливість публікації у відкритому друці.
7. До статті мають бути прикладені всі використані в роботі таблиці, графіки та ін.; список літератури подається у порядку використання джерел у статті.
8. У статті не допускається скорочень слів, крім загальноприйнятих у науковій літературі. Усі вимірювання подаються у системі одиниць СІ. Усі аббревіатури мають бути розшифровані. У числах, що являють собою десяткові дробі, цілі числа від дробової частини слід відокремлювати крапкою.
9. Усі вищезазначені матеріали мають бути надані до редакції також на магнітному носії (дискета, диск).

10. Комп'ютерний набір статті має виконуватися у текстовому редакторі MS Word 97, у разі набору в іншій версії — у форматі RTF. Формули мають бути набрані у редакторі формул, що вбудований до MS Word (Microsoft Equation 3.0.).
11. Вимоги до ілюстративного матеріалу:
 - ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті та мають бути підписаними;
 - графіки, діаграми та ін. краще будувати у табличному редакторі Excel 97. Якщо даний ілюстративний матеріал створений за допомогою інших програм, зображення слід подавати у векторному форматі WMF. Так як журнал видається у чорно-білому виконанні, графіки мають бути виконані з відповідними відтінками;
 - на графіках мають бути зазначені експериментальні точки;
 - фотографії, файли із растровими зображеннями мають бути високої якості та не мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар та ін.). Формати файлів — TIFF, BMP;
 - криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки;
 - структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані у спеціалізованих програмах типу ChemWin та надані у векторному форматі WMF;
 - різні види ілюстративного матеріалу не мають дублювати один одного.
12. Редакція залишає за собою право редагувати статті.
13. Матеріали статті автору не повертаються.
14. При невиконанні зазначених вимог статті розглядатися не будуть.
15. За достовірність інформації у публікаціях відповідальність несуть автори.