



PHARMA EQUIPMENT VI МІЖНАРОДНА ВИСТАВКА PHARMATECH EXPO

ОБЛАДНАННЯ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

20–22 жовтня 2015 року



Україна, Київ,
вул. Салютна, 2-Б

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
- Державного експертного центру МОЗ України

Організатор:



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

МІЖНАРОДНА УЧАСТЬ

НОВІ ТОРГОВІ МАРКИ, СВІТОВІ БРЕНДИ

ІННОВАЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЇ

ПОВНИЙ СПЕКТР ОБЛАДНАННЯ,
ВИТРАТНИХ МАТЕРІАЛІВ, КОМПЛЕКСНИХ
РІШЕНЬ ТА ПОСЛУГ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ
ПРОМИСЛОВОСТІ

СПЕЦІАЛЬНА ПРОГРАМА «ДНІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ»

АКТУАЛЬНІ НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ ЗАХОДИ

УКРАЇНЬСЬКА ЛАБОРАТОРНА ШКОЛА. PHARMATech

PHARMATech Demo-тури – СПЕЦІАЛІЗОВАНІ
ТЕХНІЧНІ ЕКСКУРСІЇ

ПРОГРАМИ BusinessPoint,
BuyersProgram

PHARMATech Innovation – ЗОНА ВІДКРИТИХ
ПРЕЗЕНТАЦІЙ

ОДНОЧАСНО ВІДБУДЕТЬСЯ



VIII МІЖНАРОДНА ВИСТАВКА
LAB ComplEX

АНАЛІТИКА ЛАБОРАТОРІЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ HI-TECH www.labcomplex.com

З питань участі у виставках:

+380 (44) 206-10-98

@pharm@lmt.kiev.ua

З питань участі в діловій програмі:

+380 (44) 206-10-19

@marketing@pharmcomplex.com

www.pharmcomplex.com

Зміст

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості*Зінченко О.А., Ангрющенко Т.Л., Верушкін О.Г., Безугла О.П.*

Кількісне визначення пантенолу
і метилпарагідроксibenзоату в препараті «Пантенол»,
аерозоль, методом високоефективної рідинної хроматографії 7

Фітохімічні дослідження*Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е.*

До питання морфолого-анатомічної стандартизації
лікарської рослинної сировини *Helichrysum areparium* (L.) Moench 13

Технологія лікарських засобів*Гурєєва С.М.*

Вибір допоміжних речовин з метою вдосконалення складу
та технології виготовлення таблеток антралю, вкритих оболонкою..... 20

Сіденко Л.М.

Фармацевтична розробка очних крапель азапентацен 0.015 %:
обґрунтування складу і вибір фільтруючих матеріалів 26

Ляпунов М.О., Зінченко І.О., Безугла О.П.

Оцінювання однорідності розподілу лікарських
та допоміжних речовин в м'яких лікарських засобах..... 33

Ляпунов О.М.

Дослідження розчинності мелоксикаму
та мелоксикаму трометамолу в деяких неводних та змішаних розчинниках 41

Контроль якості лікарських засобів*Назарова О.С.*

Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки
препарату-генерика антигіпертензивної дії з лізиноприлом у формі таблеток..... 49

Одинцова В.М.

Ультрафіолетова спектрофотометрія
похідних 5-(адамтан-1-іл)-4R-1,2,4-тріазол-3-тіонів 55

Колісник О.В.

Розробка методики контролю сенецифіліну
та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату
та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом ОФ ВЕТШХ..... 59

Фармакологічні дослідження*Подолюський І.М., Штриголь С.Ю., Лар'яновська Ю.Б.*

Експериментальне дослідження церебропротекторного впливу
2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону на морфологічні порушення
у структурах головного мозку щурів після черепно-мозкової травми 68

Дейко Р.Д., Штриголь С.Ю., Лар'яновська Ю.Б., Колобов О.О.

Вплив олігопептидів, аналогів ланки АКТГ₁₅₋₁₈, на гістоструктуру головного
мозку щурів із моделлю гострого порушення мозкового кровообігу 76

-
- Рецензенти: чл.-кор. НАНУ, д.фарм.н., професор Георгієвський В.П.; д.фарм.н. Котов А.Г.; д.фарм.н., професор Казарінов М.О.; д.х.н., професор Літвіненко В.І.; к.мед.н., провідний науковий співробітник Чайка Л.О.; чл.-кор. НАМНУ, професор Кресюн В.Й.;
 - Випуск підготували: Саматов Р.С., Волчик І.В., Боярська В.О., Лук'янова О.С., Вовк О.Г.
 - Рекомендовано до друку вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 4 від 13.07.2015.
 - Підписано до друку 26.08.15. Тираж 500 прим.
-

Содержание

Стандартизация лекарственных средств и валидация методов контроля качества

Зинченко А.А., Андриющенко Т.Л., Верушкин А.Г., Безуглая Е.П.

Количественное определение пантенола
и метилпарагидроксибензоата в препарате «Пантенол»,
аэрозоль, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 7

Фітохімічні дослідження

Вовк А.Г., Котов А.Г., Котова Э.Э.

К вопросу морфолого-анатомической стандартизации
лекарственного растительного сырья *Helichrysum arenarium* (L.) Moench 13

Технология лекарственных средств

Гуреева С.Н.

Выбор вспомогательных веществ с целью усовершенствования
состава и технологии изготовления таблеток антраля, покрытых оболочкой 20

Сиденко Л.Н.

Фармацевтическая разработка глазных капель азапентацен 0.015 %:
обоснование состава и выбор фильтрующих материалов 26

Ляпунов Н.А., Зинченко И.А., Безуглая Е.П.

Оценка однородности распределения лекарственных
и вспомогательных веществ в мягких лекарственных средствах 33

Ляпунов А.Н.

Исследование растворимости мелоксикама
и мелоксикама трометамола в некоторых неводных и смешанных растворителях 41

Контроль качества лекарственных средств

Назарова Е.С.

Аналитическое обеспечение фармацевтической разработки
препарата-генерика антигипертензивного действия
с лизиноприлом в форме таблеток 49

Одинцова В.Н.

Ультрафиолетовая спектрофотометрия производных
5-(адамantan-1-ил)-4R-1,2,4-триазол-3-тионов 55

Колиснык А.В.

Разработка методики контроля сенецифиллина
и других сопутствующих примесей в субстанции платифиллина гидротартрата
и инъекционном препарате «Платифиллин-Здоровье» методом ОФ ВЭТСХ 59

Фармакологические исследования

Погольский И.Н., Штрыголь С.Ю., Ларьяновская Ю.Б.

Экспериментальное исследование церебропротекторного влияния
2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она на морфологические нарушения
в структурах головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы 68

Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Ларьяновская Ю.Б., Колобов А.А.

Влияние олигопептидов, аналогов участка АКТГ₁₅₋₁₈,
на гистоструктуру головного мозга крыс
с моделью острого нарушения мозгового кровообращения 76

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 615.074

Зинченко А.А., Андрищенко Т.Л., Верушкин А.Г., Безуглая Е.П.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Количественное определение пантенола и метилпарагидроксибензоата в препарате «Пантенол», аэрозоль, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В действующей в настоящее время нормативной документации на препарат «Пантенол», аэрозоль, количественное определение пантенола и консерванта метилпарагидроксибензоата проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по двум независимым методикам. С целью сокращения времени анализа, сокращения расхода растворителей и материальных затрат разработана методика, позволяющая проводить количественное определение пантенола и консерванта в одних и тех же условиях. Хроматографирование проводят в изократическом режиме на колонке, заполненной силикагелем с привитыми бутильными группами.

Ключевые слова: пантенол, метилпарагидроксибензоат, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Препараты пантенола (декспантенола) используют при повреждениях кожи и слизистых оболочек, для лечения асептических послеоперационных ран, при солнечных и термических ожогах. Помимо действующего вещества в состав препаратов пантенола вводят консерванты, способствующие увеличению срока годности лекарственного средства. В качестве консерванта часто используют метилпарагидроксибензоат. Примером таких препаратов может служить «Пантенол» производства ООО «Микрофарм», Украина, и другие препараты, содержащие биологически активное вещество пантенол и консервант метилпарагидроксибензоат.

Количественное определение пантенола в лекарственных препаратах, в том числе и в препарате «Пантенол», проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как в прямофазном [1], так и обращенно-фазовом вариантах [2]. По отдельной методике, тоже с использованием ВЭЖХ, контролируют содержание консерванта. Время получения одной хроматограммы при определении пантенола составляет около 8 мин, столько же необходимо для получения хроматограммы при определении метилпарагидроксибензоата, причем при определении консерванта используют подвижную фазу, содержащую около 50 % ацетонитрила. Однако разработанные за последние годы новые хроматографические сорбенты и комплексный подход к разработке методик контроля качества лекарственных препаратов, основанный на функционально-стоимостном анализе, позволяют объединить определение пантенола и метилпарагидрокси-

бензоата в одной методике, что вдвое сокращает временные и материальные затраты.

Целью данной работы являлась разработка методики, позволяющей проводить количественное определение пантенола и метилпарагидроксибензоата в одинаковых условиях. В данном случае при разработке методики требовалось выбрать условия хроматографирования, при которых гидрофильное, неограниченно растворяющееся в воде вещество — пантенол — и значительно более гидрофобное вещество — метилпарагидроксибензоат — должны иметь соизмеримые времена удерживания. Предпочтительно, чтобы хроматографирование происходило в изократических условиях, что исключает необходимость уравнивания колонки после каждой хроматограммы и позволяет использовать устройство возврата подвижной фазы (Recycle valve).

Известно, что в обращенно-фазовой хроматографии времена удерживания гидрофобных соединений при использовании одной и той же фазы сокращаются с применением сорбентов с более короткой углеродной цепочкой [3]. Поэтому переход от традиционно применяемого для определения метилпарагидроксибензоата сорбента с октадецилсилильными группами к сорбентам с октильными и более короткими группами позволяет подобрать сорбент, на котором времена удерживания пантенола и метилпарагидроксибензоата будут соизмеримы. Так, при использовании колонки размером 250 мм × 4,0 мм, заполненной сорбентом Reprosil Pur C18, размер частиц — 5 мкм, при использовании подвижной фазы *вода — ацетонитрил — кис-*

лота фосфорная (870:129:1), скорости потока 1 мл/мин и температуре колонки + 50 °С время удерживания пика метилпарагидроксибензоата превышает 50 мин, при использовании колонки тех же размеров с сорбентом Reprosil Pur C8 — 34 мин. Время удерживания пика метилпарагидроксибензоата на колонке, заполненной сорбентом Reprosil Pur C4, составляет уже около 7.5 мин, что уже близко к времени удерживания пантенола — 3.5 мин. Поэтому при разработке методики была выбрана колонка, заполненная сорбентом Reprosil Pur C4.

Материалы и оборудование

Разработку методики и проведение валидационных исследований проводили на жидкостном хроматографе модели LC-20 производства фирмы Shimadzu, Япония, в комплекте: насос LC-20AB, УФ-ВИД спектрометрический детектор SPD-20 А, автоматический инжектор SIL-20 А, термостат колонок СТО-20 А. Образцы препарата, стандартные образцы пантенола и метилпарагидроксибензоата взвешивали на аналитических весах модели AUW-220D фирмы Shimadzu, неопределенность результатов взвешивания — 0.033 мг.

Методика

Приготовление испытуемого раствора. Около 0.5 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл спирта этилового 96 %, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0.47 мкм.

Приготовление раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата. Около 40 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) метилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 150 мл спирта этилового 96 %, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

Около 25 мг (точная навеска) СО пантенола помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5.0 мл раствора метилпарагидроксибензоата, доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки и перемешивают.

По 5 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата поочередно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометрическим детектором в следующих условиях:

— колонка стальная, размером 250 мм × 4.0 мм, заполненная сорбентом Reprosil Pur C4, размер частиц — 5 мкм;

— подвижная фаза: вода — ацетонитрил — кислота фосфорная концентрированная (870:129:1);

— скорость подвижной фазы — 1 мл/мин;

— температура колонки — + 50 °С;

— длина волны детектирования — 206 нм.

Содержание пантенола (X_p) в 1 г препарата, в миллиграммах, рассчитывают по формуле:

$$X_p = \frac{S_{ip} \times m_{op} \times 50 \times P}{S_{op} \times m \times 50 \times 100} = \frac{S_{ip} \times m_{op} \times P}{S_{op} \times m \times 100},$$

где:

S_{ip} — среднее значение площадей пиков пантенола, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{op} — среднее значение площадей пиков пантенола, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата;

m_{op} — масса навески СО пантенола, в миллиграммах;

m — масса препарата, в граммах;

P — содержание основного вещества в СО пантенола.

Содержание пантенола в 1 г препарата должно быть от 45.0 до 55.0 мг.

Содержание метилпарагидроксибензоата (X_n) в 1 г препарата, в миллиграммах, рассчитывают по формуле:

$$X_n = \frac{S_{in} \times m_{on} \times 50 \times 5 \times P}{S_{on} \times m \times 200 \times 50 \times 100} = \frac{S_{in} \times m_{on} \times P}{S_{on} \times m \times 4000},$$

где:

S_{in} — среднее значение площадей пиков метилпарагидроксибензоата, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{on} — среднее значение площадей пиков метилпарагидроксибензоата, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата;

m_{on} — масса навески СО метилпарагидроксибензоата, в миллиграммах;

m — масса препарата, в граммах;

P — содержание основного вещества в СО метилпарагидроксибензоата.

Содержание метилпарагидроксибензоата в 1 г препарата должно быть от 1.8 до 2.2 мг.

Хроматограмма испытуемого раствора препарата представлена на Рис. 1.

Валидация методики

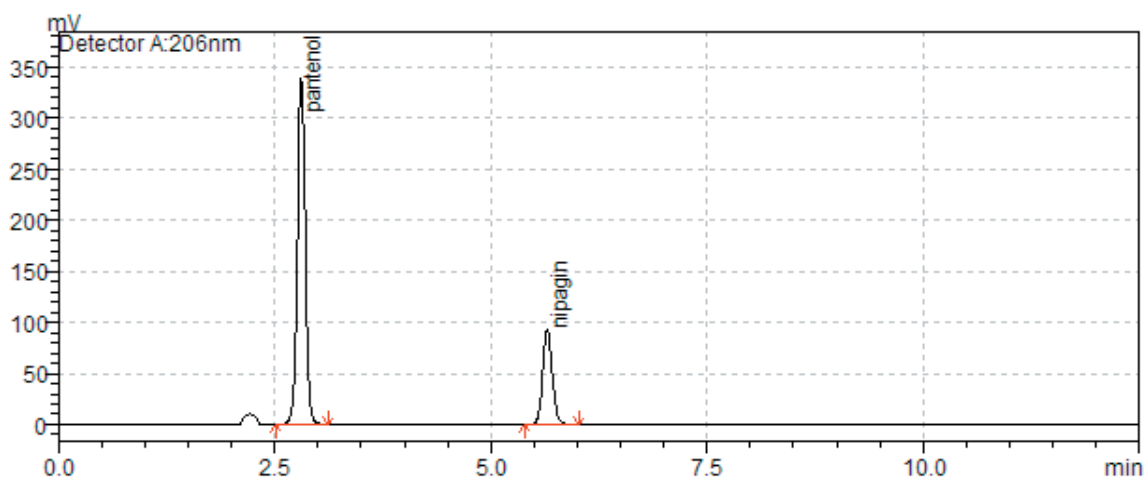
При валидационных исследованиях изучали такие характеристики, как специфичность, правильность, линейность и прецизионность в соответствии с требованиями ГФУ [4, 5].

Специфичность методики подтверждается хроматограммами испытуемого раствора плацебо препарата, на которых отсутствуют пики, совпадающие по временам удерживания с пиками пантенола и метилпарагидроксибензоата. Времена удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемого раствора совпадают с временами удерживания пиков пантенола и метилпарагидроксибензоата на хроматограммах раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата (Рис. 2).

Характеристики «правильность», «линейность» и «прецизионность» исследовали на модельных образцах препарата, приготовленных путем добавок пантенола и метилпарагидроксибензоата к навескам плацебо препарата. Навески метилпарагидроксибензоата предварительно растворяли в 200 мл метанола, а затем 5.0 мл полученных растворов прибавляли к образцам плацебо, содержащим навески пантенола.

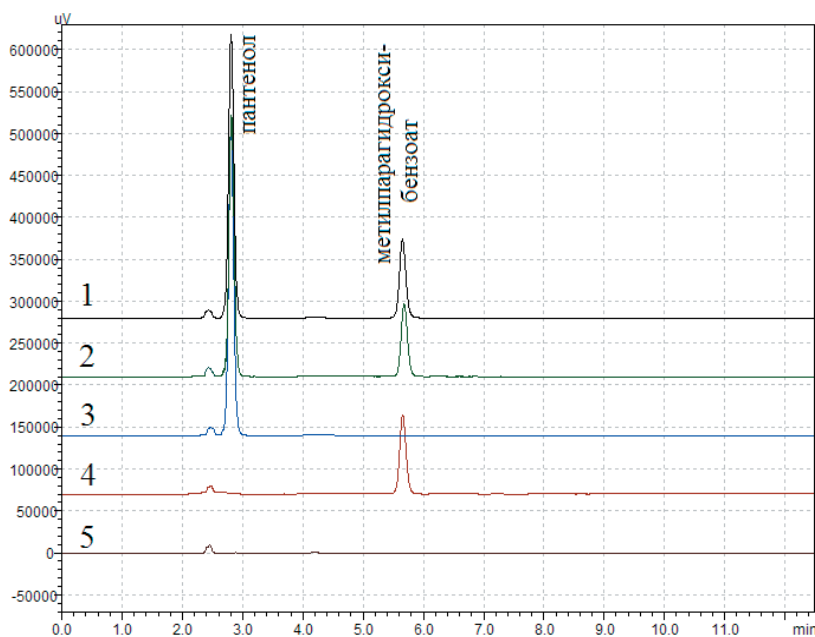
Результаты исследования валидационной характеристики «правильность» приведены в Табл. 1.

Рисунок 1



Хроматограмма испытуемого раствора препарата «Пантенол»

Рисунок 2



Хроматограммы испытуемого раствора препарата (1), раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата (2), раствора пантенола (3), раствора метилпарагидроксибензоата (4) и раствора плацебо (5)

Таблица 1

Результаты количественного определения пантенола и метилпарагидроксибензоата в модельных образцах и их статистическая обработка

№ модельного образца	Введено, в мг/г (X_i , факт.)	Найдено, в мг/г (Y_i , найд.)	Найдено, в % к введенному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$
ПАНТЕНОЛ			
1	39.88	39.846	99.916
2	43.1	43.158	100.134
3	45.02	45.394	100.831
4	46.86	46.472	99.172
5	50.54	50.848	100.610
6	52.5	52.028	99.100
7	54.9	55.055	100.283
8	57.24	56.907	99.418
9	60.16	60.492	100.551
Среднее, $Z_{cp}, \% =$			100.001
Относительное стандартное отклонение, $RSD_z, \% =$			0.643
Относительный доверительный интервал $\Delta_z, \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1.895 \times 0.643 =$			1.218
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta_{Asr}, \% =$			3.2
Систематическая ошибка $\Delta \% = Z_{cp} - 100 =$			0.001
Критерий незначимости систематической ошибки:			
1) статистическая незначимость: $\Delta < \Delta_z / \sqrt{9} = 1.218 / 3 = 0.406 \% > 0.001 \%$			Выполняется
Если не выполняется 1), то $\Delta \leq \max \Delta$:			
2) практическая незначимость: $\Delta \% \leq 0.32 \times 3.2 = 1.024 \% > 0.001 \%$			Выполняется
Общий вывод о методике			Корректна
МЕТИЛПАРАГИДРОКСИБЕНЗОАТ			
1	1.61	1.622	100.710
2	1.69	1.686	99.237
3	1.80	1.802	100.034
4	1.92	1.952	101.561
5	1.99	1.974	98.865
6	2.09	2.061	98.420
7	2.20	2.216	100.502
8	2.31	2.341	101.225
9	2.40	2.385	99.468
Среднее, $Z_{cp}, \% =$			100.003
Относительное стандартное отклонение, $RSD_z, \% =$			1.081
Относительный доверительный интервал $\Delta_z, \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1.895 \times 1.081 =$			2.049
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta_{Asr}, \% =$			3.2
Систематическая ошибка $\Delta \% = Z_{cp} - 100 =$			0.003
Критерий незначимости систематической ошибки:			
1) статистическая незначимость: $\Delta < \Delta_z / \sqrt{9} = 2.049 / 3 = 0.683 \% > 0.003 \%$			Выполняется
Если не выполняется 1), то $\Delta \leq \max \Delta$:			
2) практическая незначимость: $\Delta \% \leq 0.32 \times 3.2 = 1.024 \% > 0.003 \%$			Выполняется
Общий вывод о методике			Корректна

По результатам хроматографирования испытуемых растворов модельных образцов препарата рассчитаны и коэффициенты линейной зависимости найденного количества пантенола и метилпарагидроксибензоата от введенного. Результаты представлены на Рис. 3 и 4 и в Табл. 2.

Обсуждение полученных результатов

Как следует из представленных данных, валидационные характеристики разработанной методики количественного определения пантенола и метилпарагидроксибензоата в препарате «Пантенол», аэрозоль, соответствуют фармакопейным критериям.

Величина неопределенности приготовления испытуемого раствора составляет 0.175 %. Неопределенность приготовления раствора сравнения пантенола и метилпарагидроксибензоата составляет: для пантенола – 0.818 %, для метилпарагидроксибензоата – 0.806 %. Следовательно, суммарное значение величины неопределенности пробоподготовки испытуемого раствора и раствора сравнения составляет: для пантенола – 0.837 %, для метилпарагидроксибензоата – 0.825 %.

Величина неопределенности конечной аналитической операции – получение 5 хроматограмм испытуемого раствора – составляет: для пантенола – 0.828 %, для метилпарагидроксибензоата – 0.796 %; получение 5 хроматограмм раствора сравнения: для пантенола – 0.712 %, для метилпарагидроксибензоата – 0.791 %. От-

сюда суммарное значение величины неопределенности конечной аналитической операции для пантенола равно 1.0 %, для метилпарагидроксибензоата – 1.12 %. Суммарная неопределенность методики для пантенола составляет 1.37 %, для метилпарагидроксибензоата – 1.39 %.

Эти величины не превышают предельно допустимое значение 3.2 % для аналитической методики при допустимом 10%-ном отклонении концентраций действующих веществ в препарате. Следовательно, разработанная методика количественного определения пантенола и метилпарагидроксибензоата может использоваться для контроля качества препарата «Пантенол», аэрозоль.

Рисунок 3

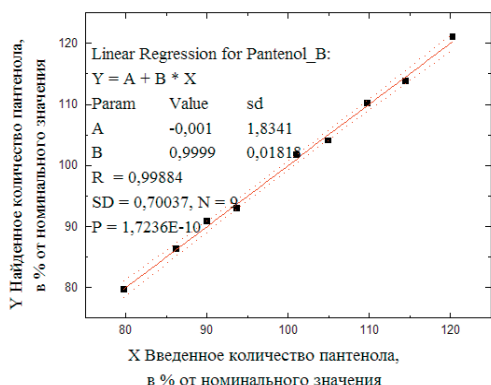


График и коэффициенты линейной зависимости найденного количества пантенола от введенного

Рисунок 4

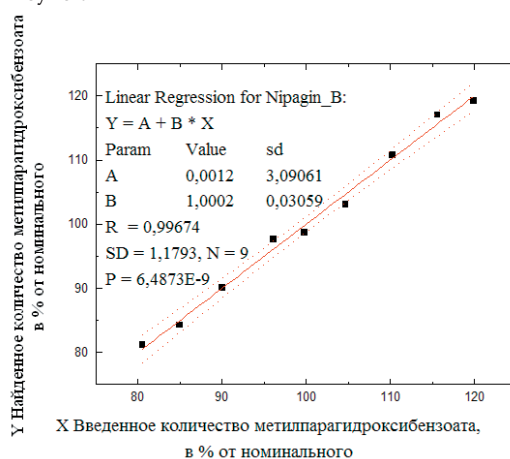


График и коэффициенты линейной зависимости найденного количества метилпарагидроксибензоата от введенного

Таблица 2

Метрологические характеристики линейной зависимости найденных концентраций пантенола и метилпарагидроксибензоата от их введенной концентрации

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Заключение
ПАНТЕНОЛ				
b	0.9999			
S _b	0.01818			
a	-0.001	≤ 3.48	≤ 5.12	Выполняются по 1 критерию
S _a	1.8341			
SD ₀	0.7004			
SD ₀ /b	0.7005	≤ 1.68		Выполняются
r	0.99884	≥ 0.99236		Выполняются
МЕТИЛПАРАГИДРОКСИБЕНЗОАТ				
b	1.002			
S _b	0.03059			
a	0.0012	≤ 5.86	≤ 5.12	Выполняются по 1 критерию
S _a	3.0906			
SD ₀	1.1793			
SD ₀ /b	0.7092	≤ 1.68		Выполняются
r	0.99988	≥ 0.99236		Выполняются

Следует отметить, что в сравнении с ныне используемыми методиками разработанная методика, помимо двукратного сокращения времени для определения количественного содержания пантенола и метилпарагидроксибензоата в препарате «Пантенол», аэрозоль, позволяет в 5 раз сократить расход ацетонитрила, а стоимость выполнения одного определения сокращается в 18 раз. Метрологические характеристики разработанной методики близки к метрологическим характеристикам методик действующего нормативного документа.

Выводы

Разработана методика количественного определения пантенола и метилпарагидроксибензоата в препарате «Пантенол», аэрозоль, методом ВЭЖХ в изократических условиях.

Проведенное исследование основных валидационных характеристик методики подтверждает, что методика соответствует критериям, предъявляемым для методик количественного определения действующих веществ и консервантов в лекарственных средствах.

Разработанная методика позволяет сократить расход токсичного ацетонитрила в 5 раз при сокращении стоимости анализа в 18 раз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kulikov A.U. «Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination dexpanthenol in pharmaceutical formulation» / Kulikov A.U., Zinchenko A.A. // Journal Pharmaceutical and Biomedical analysis. — Vol. 43, in. 3. — 19 February 2007. — P. 7.
2. Mao Xi-Qin. Simultaneous determination of pantothenic acid and D-panthenol in cosmetics by high performance liquid chromatography[J] / Mao Xi-Qin, Hu Xia, Pan Wei // Chinese Journal of Chromatography. — 2010. — 28 (11). — P. 1061-1066.
3. Шатц В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / Шатц В.Д., Сахартова О.В. — Рига: Зинатне, 1988. — 390 с.
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. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. — М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. — 58 с.

УДК 615.074

Резюме

Зінченко О.А., Андрющенко Т.Л.,
Верушкін О.Г., Безугла О.П.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Кількісне визначення пантенолу і метилпарагидроксибензоату в препараті «Пантенол», аэрозоль, методом високоефективної рідинної хроматографії

У чинній нормативній документації на препарат «Пантенол», аэрозоль, кількісне визначення пантенолу і кон-

серванта метилпарагидроксибензоату проводять методом високоефективної рідинної хроматографії двома незалежними методиками. З метою скорочення часу аналізу, скорочення витрат розчинників і матеріальних витрат розроблено методику, яка дозволяє проводити кількісне визначення пантенолу і консерванта в тих самих умовах. Хроматографування проводять в ізократичному режимі на колонці, заповненій силікагелем з прищепленими бутильними групами.

Ключові слова: пантенол, метилпарагидроксибензоат, високоефективна рідинна хроматографія.

UDC 615.074

Summary

Zinchenko O.A., Andrushenko T.L.,
Veruchkin O.G., Bezuglaya O.P.

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

HPLC method of assay of panthenol and methyl-p-hydroxybenzoate in «Panthenol», spray

HPLC method that allows simultaneous assay panthenol and methyl-p-hydroxybenzoate in «Panthenol», spray was developed. Chromatographic realize in isocratic mode with butylsilyl silica gel column using. Chromatographic analysis were run on Reprosil Pur C4 (250 × 4.0 mm) analytical column and mobile phase containing water — acetonitrile — concentrated ortho-phosphoric acid (870 : 129 : 1) (v/v/v) was used. Flow rate was 1 ml/min. Analysis were done at + 50 °C and detection wavelength was 206 nm. As compared with method that included in working normative documents, the proposed method allows to reduce the organic solvent amount that needed for the analysis, and analysis cost in 18 times.

It was sounded, that panthenol and methyl-p-hydroxybenzoate assay results did not have systematic bias (errors), and linear regression coefficient in the range of 80 — 120 % from nominal value was 0.99884 for panthenol and 0.99988 for methyl-p-hydroxybenzoate.

Keywords: panthenol, methyl-p-hydroxybenzoate, high-performance liquid chromatography.

Зінченко Александр Анатольевич. Окончил Харьковский государственный университет (1983). Зав. лабораторией фармакопейного анализа ГП «Фармакопейный центр». К.фарм.н. (2006).

Андрющенко Татьяна Леонидовна. Окончила Харьковский государственный университет (1998). Зам. зав. лабораторией фармакопейного анализа ГП «Фармакопейный центр».

Верушкин Алексей Геннадиевич. Окончил Харьковский государственный университет (1993). Старший научный сотрудник лаборатории фармакопейного анализа ГП «Фармакопейный центр».

Безуглая Елена Петровна. Ст. науч. сотр. отдела № 8 Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013). К.фарм.н. (1996). Ст. науч. сотр. (2000).

Фітохімічні дослідження

УДК 615.11

Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е.

Державне підприємство «Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів»

До питання морфолого-анатомічної стандартизації лікарської рослинної сировини *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

Порівняно підходи щодо морфолого-анатомічної стандартизації лікарської рослинної сировини (ЛРС) цмину піскового квітки в Німецькому фармацевтичному кодексі (DAS) і ГФ XI видання.

Показана важливість морфологічного, анатомічного і товарознавчого аналізу для ідентифікації та стандартизації цього виду сировини.

За результатами анатомічного дослідження ЛРС визначено перелік основних мікроскопічних діагностичних структур. Досліджено 11 зразків вітчизняної сировини стосовно її відповідності вимогам розділу «Сторонні домішки» монографій на цмин з ГФ XI та DAS. Одержані результати будуть використані при підготовці розділів «Ідентифікація А», «Ідентифікація В» та «Сторонні домішки» національної монографії «Цмину піскового квітки^N», що буде введена до ДФУ.

Ключові слова: цмину піскового квітки, морфологія, мікроскопія, стандартизація, монографії на лікарську рослинну сировину, Державна Фармакопея України.

Через зростання токсико-алергічних захворювань і лікарської резистентності внаслідок застосування синтетичних препаратів сучасна медицина все частіше пропонує лікарські засоби рослинного походження.

Так, одним із перспективних джерел одержання препаратів ще у 80-х роках минулого століття і до теперішнього часу є лікарська рослинна сировина (ЛРС) цмину піскового (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) суцвіття [1].

Основним документом, що встановлює вимоги до ЛРС в Україні, є монографія Державної Фармакопеї України (ДФУ) [2]. На сьогодні монографія на даний вид ЛРС відсутня в ДФУ та Європейській Фармакопеї (ЄФ). Тому при розробці методик контролю якості сировини та препаратів з неї виробники спираються на вимоги монографій «Цветки бессмертника песчаного» ГФ XI [3] та «Ruhrkrautbluten» з Німецького фармацевтичного кодексу (DAS) [4]. Ці документи містять принципово різні підходи щодо хімічної ідентифікації сировини та її кількісного визначення, наявні деякі відмінності у встановленні числових показників, регламентується різний період збору рослини. Як показали наші дослідження [5], кількісне визначення флавоноїдів за методикою, наведеною в [2], не є специфічним, оскільки визначення проводять за довжини хвилі 315 нм, яка не відповідає максимуму поглинання ізосаліпурпозиду в умовах методики, що призводить до суттєвого завищення результатів. Водночас методика кількісного визначення флавоноїдів, запропонована DAS та сьогодні впроваджена у ряді національних частин монографій ДФУ на

ЛРС, є більш прийнятною для кількісної оцінки сировини [6].

Відсутність національної нормативної документації негативно впливає на формування критеріїв якості лікарських засобів, функціональних харчових добавок і дієтичних добавок. Це ускладнює стандартизацію сировини і препаратів, які містять цмин пісковий.

Мета даної роботи — порівняти підходи та методи стандартизації сировини, що містяться у монографії DAS «Ruhrkrautbluten» та статті ГФ XI «Цветки бессмертника песчаного».

Для цього необхідно було дослідити зразки даної ЛРС, наявні на вітчизняному фармацевтичному ринку, щодо їх відповідності вимогам зазначених документів за морфологічними (зовнішніми) ознаками і за наявністю в сировині відповідних діагностичних мікроскопічних структур; визначити якість сировини за ступенем її забруднення сторонніми домішками; врахувати одержані результати при розробці національної монографії «Цмину піскового квітки»^N для введення її до ДФУ.

Об'єкти дослідження — зразки ЛРС ц. піскового квітки, надані підприємствами ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"» (1, 2, 3, 4), Луганська фармацевтична фабрика (5, 6), ТОВ «Науково-виробнича фармацевтична компанія "Ейм"» (11) та заготовлені постачальниками в 2011-2014 роках в Харківській (7, 8, 9) та Полтавській (10) областях.

Дослідження проведено відповідно до «Порядку розробки монографій на лікарську рослинну сировину (ЛРС) для введення до ДФУ» [7].

Таблиця 1

Порівняльні дані визначення, властивостей і макроскопічних ознак лікарської рослинної сировини *H. arenarium* за монографією ДАС та статтею ГФ XI

Показник	ДАС «Ruhrkrautbluten» (цмину квітки)	ГФ XI «Цветки бессмертника песчаного»
Визначення	Висушені, цілі або різані суцвіття <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench (Asteraceae).	Зібрані до розкривання квіток, висушені кошики дикорослої багаторічної трав'янистої рослини <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench, родини айстрових — Asteraceae.
Властивості	Сировина має слабкий духмяний запах.	Сировина має слабкий духмяний запах.
	Сировина має дещо гіркуватий смак.	Сировина має пряно-гіркий смак.
Макроскопія (зовнішні ознаки)	Сировина складається із численних багатоквіткових, до 7 мм у діаметрі, кошиків на коротких повстяно-опушених квітконосах, зібраних у щиткоподібні суцвіття.	Кошики кулясті, поодинокі або по декілька разом, багатоквіткові, до 7 мм у діаметрі, на коротких повстяно-опушених квітконосах до 1 см завдовжки.
	Обгортка кошика близько 5 мм завдовжки, чашоподібної форми, складається із (30-50) приквітків жовтого кольору, розташованих черепитчасто-багаторядно.	Обгортка кошика — із численних, нещільно розташованих приквітків лимонно-жовтого кольору.
	Зовнішні приквітки яйцеподібно-ланцетної форми, плівчасті, внутрішні — вузько-ланцетні, мають незвичайний опуклий вид.	Приквітки увігнуті, сухі, плівчасті, блискучі, лимонно-жовтого кольору: зовнішні — яйцеподібні, середні — лопатоподібно-видовжені, внутрішні — вузькі, лінійні.
	Квітколоже голе.	Квітколоже голе.
	Численні трубчасті квітки (6-7) мм завдовжки, від жовтого до оранжево-жовтого кольору, крайній ряд яких утворений крайовими жіночими квітками, а розташовані на диску квітки двостатеві. Трубочка віночка розгортається 5 трикутними лопатями. Усі квітки мають волосоподібний чубок майже однакової із трубкою довжини та нижню, відносно коротку зав'язь. Різана сировина вирізняється більш повстистими сплутаними кошиками та стеблами.	Усі квітки трубчасті, п'ятизубчасті, двостатеві, лимонно-жовтого кольору, із чубком.

Перш за все було здійснено порівняльний аналіз підходів щодо ідентифікації та стандартизації ЛРС *H. arenarium*, наведених у монографії «Ruhrkrautbluten» і статті ГФ XI «Цветки бессмертника песчаного» (Табл. 1).

При порівнянні даних ДАС і ГФ XI відносно визначення сировини, її властивостей та морфологічних ознак з'ясувалося таке.

ДАС для назви монографії застосовує лише назву роду та орган рослини, ГФ XI у назві статті підкреслює, що лікарською сировиною є квітки лише цмину піскового.

Визначення. В обох документах співпадає назва виду латиною та вимоги щодо висушування сировини, але ДАС зауважує, що суцвіття можуть бути цілими або різаними. ГФ XI наголо-

шує, що сировину — кошики — мають збирати до розкривання квіток, що є дуже слушним зауваженням, бо при недотриманні цієї вимоги квітки — дуже важлива складова сировини — при їх висушуванні висипаються.

Властивості. Дані щодо властивостей сировини, а саме її запаху та смаку, ідентичні в обох документах.

Макроскопія. За даним показником слід відзначити таке:

- морфологічні ознаки кошиків ідентичні, але ГФ XI підкреслює, що довжина квітконосів стебел під кошиками не має перевищувати 1 см;
- описуючи морфологічну будову обгортки кошиків, ДАС розрізняє лише її зовнішні

Таблиця 2

Порівняльні дані щодо діагностичних мікроскопічних ознак лікарської рослинної сировини *H. arenarium* за монографією ДАС та статтею ГФ XI

Показник	ДАС «Ruhrkrautbluten» (цмину квітки)	ГФ XI «Цветки бессмертника песчаного»
	Сировину подрібнюють на порошок (710). Порошок жовтавого кольору.	Розділяють кошик на окремі частини.
	Переглядають під мікроскопом, використовуючи хлоральгідрату розчин Р.	Переглядають під мікроскопом приквітки обгортки та квітки (вигляд зверху), використовуючи хлоральгідрату розчин.
	У порошок виявляються такі діагностичні структури:	Виявляються такі діагностичні структури:
	фрагменти приквітків із епідермою із прямокутних, видовжених (у подовжньому зрізі) клітин із загостреними кінцями або косими перегородками;	верхня епідерма приквітків обгортки кошика із прямокутних, видовжених клітин із пористими оболонками;
	батогоподібні покривні волоски або їх фрагменти із 2 або 3 коротких базальних клітин і однієї дуже довгої, звивистої кінцевої клітини;	в епідермі звуженої частини приквітків обгортки виявляються численні покривні батогоподібні волоски із (2-3) коротких базальних клітин і дуже довгої, тонкої, звивистої кінцевої клітини;
	дуже рідко ефіроолійні залозки <i>Asteraceae</i> типу;	на внутрішніх та середніх приквітках обгортки зрідка трапляються двоярядні, (4-5)-ярусні ефіроолійні залозки <i>Asteraceae</i> типу із (8-12) клітин;
		на трубочці та зубцях віночка та зав'язі виявляються численні ефіроолійні залозки <i>Asteraceae</i> типу із великим кутикулярним пухирем;
		на віночку численні залозисті волоски з одноклітинною голівкою та (12-14)-клітинною ніжкою;
	фрагменти чубка трубчастих квіток із пучка зрослих біля основи волосків, верхівки яких по всій довжині косо зазубрені;	волоски чубка, зрослі біля основи, багатоклітинні, із зазубреними краями;
	округлі пилкові зерна близько 25 мкм у діаметрі з 3 проростковими порами та короткошипуватою екзиною;	
	фрагменти зав'язей переважно із одношаровим кільцем кам'янистих клітин біля основи та численними булавоподібними залозками.	овальна зав'яз із численними здутими волосками та кільцевою основою із чотирикутних товстостінних клітин.

та внутрішні приквітки, ГФ XI дає дещо детальніший опис обгортки, вирізняючи за формою зовнішні, середні та внутрішні приквітки;

- за ДАС зовнішні, *крайові квітки* цмину пісового жіночі, а *внутрішні* — *двостатеві*, за ГФ XI *всі квітки є двостатевими*;
- ДАС підкреслює, що всі квітки кошика мають *чубок*, довжина якого майже дорівнює трубочці квітки, ГФ XI лише констатує, що всі квітки кошика із чубком;
- ДАС, характеризуючи *різану сировину*, звертає увагу, що у її складі більш повстані та сплутані кошики і стебла.

Аналіз даних, наведених у Табл. 1, свідчить, що більшість діагностичних морфологічних ознак ЛРС *H. arenarium* в обох документах співпадає. Однак є певні відмінні.

У зазначених документах виявлені розбіжності щодо макроскопічних ознак сировини, зокрема статі квіток у кошиках ц. пісового (за ДАС зовнішні, крайові квітки в кошику жіночі, а центральні — двостатеві; за ГФ XI всі квітки в кошику двостатеві.) За проаналізованими описами морфологічної будови суцвіть [8, 9, 10] в кошиках *H. arenarium* розвиваються два типи квіток: зовнішні — жіночі, а центральні — двостатеві. ГФ XI, стверджуючи, що в кошиках всі квітки двостатеві, ймовірно має

Таблиця 3

Результати аналізу зразків лікарської рослинної сировини *H. arenarium* на відповідність вимогам монографії DAC «Ruhrkrautbluten»

Показник	Нормування	Зразок										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Визначення	Відповідно до монографії DAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Властивості: — запах; — смак.	Відповідно до монографії DAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ідентифікація: — макроскопія; — мікроскопія.	Відповідно до монографії DAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сторонні домішки: — суцвіття <i>H. stoechas</i> (L.) DC; — суцвіття <i>H. angustifolium</i> DC.	Не більше 2 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примітки:

«+» — сировина відповідає вимогам;

«—» — сировина не відповідає вимогам.

Таблиця 4

Результати аналізу зразків лікарської рослинної сировини *H. arenarium* на відповідність вимогам статті ГФ XI «Цветки бессмертника песчаного»

Показник	Нормування	Зразок										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Визначення	Відповідно до статті ГФ XI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Властивості: — запах; — смак.	Відповідно до статті ГФ XI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ідентифікація: — макроскопія; — мікроскопія.	Відповідно до статті ГФ XI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сторонні домішки: — суцвіття із залишками стебел понад 1 см завдовжки;	Не більше 5 %	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—
— залишків кошиків (ложа кошиків із обгортками);	Не більше 5 %	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—
— сторонніх частинок.	Не більше 1 %	+	—	+	+	—	+	—	—	+	+	+

Примітки:

«+» — сировина відповідає вимогам;

«—» — сировина не відповідає вимогам.

на увазі, що при запізнілій заготівлі сировини саме зовнішні квітки висипаються із ложа кошика першими.

Порівняння методу мікроскопічного аналізу ЛРС, застосовуваного DAC і ГФ XI (Табл. 2), та одержаних результатів свідчить, що:

— за DAC сировину подрібнюють на порошок, визначають його забарвлення, переглядають

під мікроскопом і виявляють діагностичні мікроструктури сировини; за ГФ XI кошик розділяють на приквітки та квітки, переглядають їх під мікроскопом (вигляд зверху) і визначають риси, характерні для даної ЛРС;

— між DAC і ГФ XI відсутні розбіжності в описі таких діагностичних структур: клітин

- епідерми приквітків, батогоподібних покривних волосків, чубка, ефіроолійних залозок, наявності біля основи зав'язі кільця кам'янистих клітин;
 - ГФ XI, крім того, описує наявні на віночку залозисті волоски;
 - за DAC зав'язь вкрита численними булавоподібними залозками, ГФ XI називає волоски здутими та не визначає їх типу;
 - DAC описує морфологію пилкових зерен і відносить їх до важливих діагностичних структур ЛРС цмину піскового; у ГФ XI ця інформація відсутня;
 - DAC, окрім текстового опису мікроскопічних структур, наводить рисунки епідерми приквітка, фрагментів батогоподібних покривних волосків, фрагмента волоска чубка, фрагментів зав'язі з булавоподібними залозистими волосками та ефіроолійної залозки на ніжці, що є важливим доповненням для достовірної ідентифікації ЛРС.
- Дані, наведені в Табл. 2, проказують, що, незважаючи на розбіжності у методиці мікроско-

пічного аналізу сировини (за DAC досліджують здрібнену на порошок сировину, а за ГФ XI переглядають (вигляд зверху) приквітки обгортки та квітки кошика), більшість мікроскопічних ознак в обох документах співпадає. Наш досвід мікроскопічного аналізу численних зразків ЛРС переконує в тому, що для мікроскопічного аналізу даної сировини доцільніше застосовувати метод, запроваджений ГФ XI, як простіший, дешевший та переконливіший.

Між тим зауважимо: численні трихоми, що густо вкривають зав'язь *H. arenarium*, DAC називає булавоподібними залозками, ГФ XI — здутими волосками, тим самим не визначаючи їх типу та функцій. Так само, як ГФ XI, трактують ці структури автори публікацій минулого століття [11, 12]. Більшість авторів сучасних публікацій [13, 14, 15, 16, 17] визначають ці структури тотожно з DAC як булавоподібні залозисті волоски.

Автори у роботі [18] називають їх багатоклітинними волосками, далі уточнюють: «Волосок состоит, как правило, из двух клеток основания,

Таблиця 5

Діагностичні морфологічні ознаки деяких видів рослин — можливих домішок до сировини *H. arenarium* (L.) Moench

Ознаки	<i>H. arenarium</i> (L.) Moench	<i>H. corymbiforme</i> Opperm. ex Katina	<i>H. graveolens</i> (Bieb.) Sweet	<i>Antennaria dioica</i> (L.) Gaertn.
Опушення	Сіро-повстяне	Густе, білувато-повстяне	Густе, сірувато-шерстисто-повстяне	Білувато-повстяне
Суцвіття	Щиткоподібні, із кошиків, густі, округлі	Щиткоподібні волоті, із кошиків, пухкі, майже плоскі	Щиткоподібні, із кошиків, дуже густі, нагадують голівку, округлі	Щиткоподібні або голівчасті, із кошиків, густі
Кошики	Кулясті або широко-обернено-яйцеподібні, сидячі або майже сидячі, в числі (10-30) (100)	Коротко-еліпсоподібні або яйцеподібні, на ніжках	Кулясті або дзвоникоподібні, на коротких ніжках, майже сидячі	Кулясті, в числі (3-15), 5-6 мм завширшки
Приквітки обгортки	Лимонно-жовті, рідко оранжеві, численні (до 50), зовнішні значно коротші за внутрішні	Лимонно-жовті, зрідка оранжеві	Яскраво-жовті, в числі до 25 (40), зовнішні лише в (2-3) рази коротші за внутрішні	Білі, рожеві, зрідка червонуваті
Квітки	Жовті або оранжево-жовті	Жовті	Жовті	Білі або рожевуваті
Сім'янка	Довгаста, із шипуватою поверхнею, коричнювата	Гладенька, гола	Довгаста	До 1 мм завдовжки, гола
Чубок	Із тонких м'яких зазубрених жовтаво-білих волосків	Із зазубрених волосків	Із тонких білих ламких волосків	Із дуже тонких шовковистих шершавих волосків
Місця зростання	Піски, степові схили, відслонення, сухі ліси по всій Україні	Приморські піски вздовж узбережжя Чорного та Азовського морів	На яйлах і гірських схилах Криму	Соснові та змішані ліси, схили по всій Україні

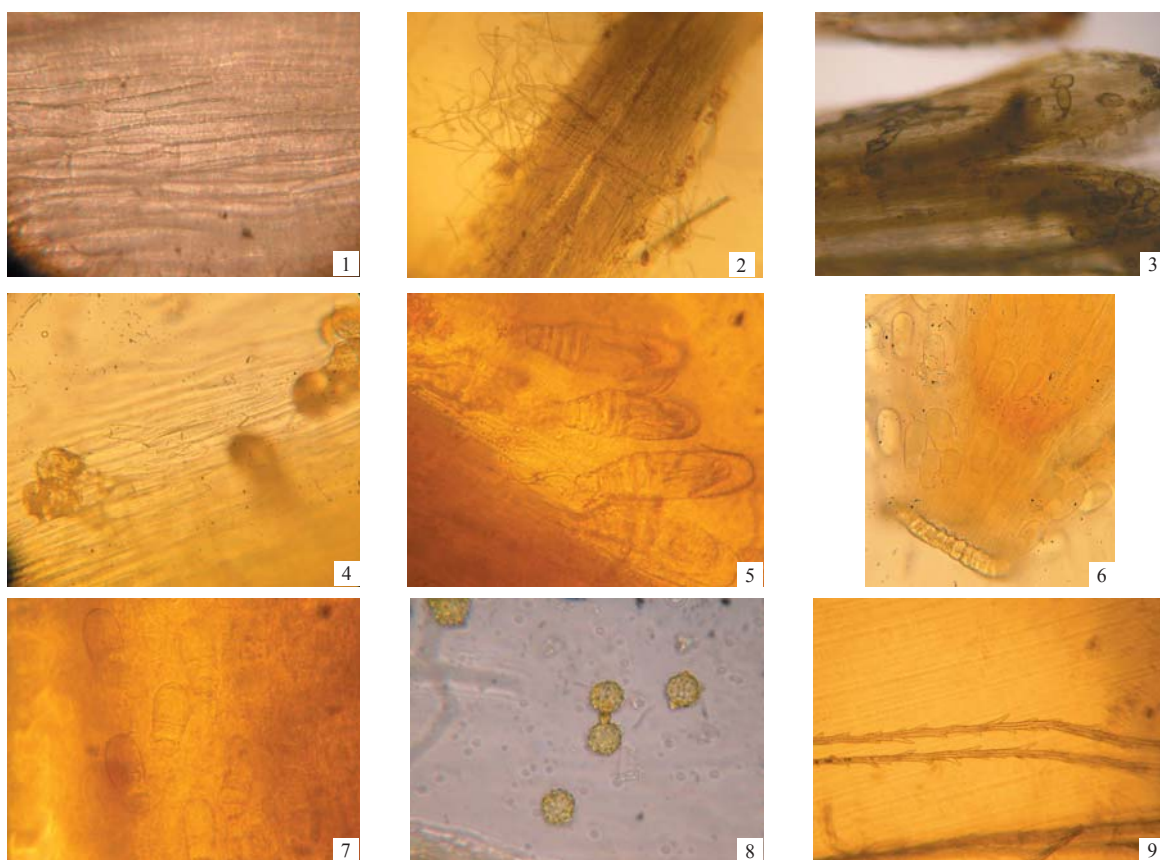
небольших по сравнению с конечной клеткой». Неоднозначність думок різних авторів свідчить, що залозисті структури епідерми *H. arenarium* дуже своєрідні. Ідентичні залозисті структури ми спостерігали у *Gnaphalium uliginosum* L. Як і у *H. arenarium*, вони морфологічно дещо відрізняються від аналогічних структур інших *Asteraceae*.

Мікроскопічне дослідження ЛРС *H. arenarium* ми проводили за методикою ГФ XI: досліджували приквітки обгортки кошика та квітки (вигляд зверху) в хлоральгідрату розчині під мікроскопом Меорта, фотографували фотоапаратом Canon. Виявлені діагностичні мікроструктури наведено на Рис. 1.

Згідно з вимогами ДАС і ГФ XI нами визначено вміст сторонніх домішок у сировині досліджуваних зразків ЛРС *H. arenarium* (Табл. 3 і 4). Усім вимогам, які регламентує ГФ XI, відповідає лише сировина зразка 4 (Луганська фармацевтична фабрика). Більшість зразків ЛРС (1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11) мали біля суцвіть-кошиків квітконоси-залишки стебел понад 1 см завдовжки. Цей показник коливається в межах від 11,7 % (8 зразок) до 100 % (10 зразок), де залишки стебел біля кошиків досягали довжини (10-15) см.

Сировина зразків (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11) перевищувала норму ГФ XI щодо кількості «порож-

Рисунок 1



Діагностичні мікроструктури лікарської рослинної сировини *H. arenarium*:

- 1 — верхня епідерма приквітка;
- 2 — фрагмент приквітка із покривними батопоподібними волосками та ефіроолійними залозками, $\times 100$;
- 3 — лопаті віночка із залозистими волосками, $\times 100$;
- 4 — фрагмент трубочки віночка із ефіроолійними залозками, $\times 100$;
- 5 — фрагмент трубочки віночка із ефіроолійними залозками $\times 400$;
- 6 — зав'язь зі склеренхімним кільцем біля основи та численними булавоподібними залозистими волосками на її поверхні, $\times 100$;
- 7 — фрагмент зав'язі із булавоподібними залозистими волосками на її поверхні, $\times 400$;
- 8 — пилкові зерна, $\times 400$;
- 9 — фрагменти волосків чубка, $\times 400$.

ніх» кошиків — обгорток без квіток — від 5.5 % (6 зразок) до 92.5 % (3 зразок).

За кількістю сторонніх часток відповідала вимогам ГФ XI сировина більшості зразків (1, 3, 4, 6, 9, 10, 11).

У сировині всіх досліджених зразків кількість сторонніх домішок перевищувала 2 %, тобто сировина не відповідає вимогам якості, регламентованим ДАС. ДАС, крім загального числового показника якості сировини, зазначає, що у сировині як сторонні домішки можуть бути суцвіття інших видів *Helichrysum*: *H. stoechas* (L.) DC та *H. angustifolium* DC.

З метою попередження фальсифікації сировини *H. arenarium* наводимо відмінні ознаки деяких видів флори України, що можуть бути домішками до ЛРС *H. arenarium* (Табл. 5).

Інформація, наведена в Табл. 5, є необхідною як при заготівлі, так і при первинному експрес-аналізі сировини, що, безумовно, сприятиме покращенню якості ЛРС *H. arenarium*.

Висновки

Порівняно підходи щодо морфолого-анатомічної стандартизації ЛРС цмину піскового квітки та визначено перелік основних мікроскопічних діагностичних структур.

За результатами досліджень 11 зразків сировини зроблено висновок щодо відповідності вітчизняної сировини вимогам розділу «Сторонні домішки» відповідних монографій ГФ XI та ДАС.

Одержані результати будуть використані при розробці національної монографії «Цмину піскового квітки^N» для введення її до ДФУ.

УДК 615.11

Резюме

Вовк А.Г., Котов А.Г., Котова Э.Э. Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

К вопросу морфолого-анатомической стандартизации лекарственного растительного сырья *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

Проведено сравнение подходов к морфолого-анатомической стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) бессмертника песчаного цветки в немецком фармацевтическом кодексе (ДАС) и ГФ XI издания.

Показана важность морфологического, анатомического и товароведческого анализа для идентификации и стандартизации этого вида сырья.

По результатам анатомического исследования определен перечень основных микроскопических диагностических структур. Исследовано 11 образцов отечественного сырья на его соответствие требованиям раздела «Посторонние примеси» монографий на бессмертник по ГФ XI и ДАС.

Полученные результаты будут использованы при подготовке разделов «Идентификация А», «Идентификация В» и «Посторонние примеси» национальной монографии «Цмину піскового квітки^N» для введения ее в ДФУ.

Ключевые слова: бессмертника песчаного цветки, морфология, микроскопия, стандартизация, монографии на

лекарственное растительное сырье, Государственная Фармакопея Украины.

UDC 615.11

Summary

Vovk O.G., Kotov A.G., Kotova E.E.

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

To the question of the morphological and anatomical standardization for herbal drug *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

A comparison of approaches to morphological and anatomical standardization of herbal drug Immortelle flowers in the German Pharmaceutical Codex (DAC) and SP XI edition has been conducted. The importance of morphological, anatomical and merchandising analysis for identification and standardization of this drug is shown.

The data analysis shows that most of the diagnostic morphological features of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench in both documents are the same. However, there are certain differences. Differences regarding the sex of flowers in capitula immortelle are detected in these documents. In accordance with the DAC: external, marginal flowers in a capitula — female, and Central — hermaphrodite. By SP XI: all the flowers in capitula — telianthus.

It is shown that, though differences in the methods of microscopic analysis (by DAC is analyses the powdered drug, and by SP XI is examines bracts of involucre and flowers capitula), most microscopic signs in both documents are the same. According to the results of the anatomical study has been identified a list of major microscopic diagnostic structures. Eleven samples of drugs for compliance of domestic materials with the requirements section of the «Impurities» by SP XI and DAC was studied. In all studied samples, the amount of impurities was more than 2 %, that is, the drug did not compliance the quality requirements regulated by the DAC. DAC, in addition to total content of impurities, notes that in the drugs as impurities can be other inflorescences of *Helichrysum* species: *H. stoechas* (L.) DC and *H. angustifolium* DC. The results will be used in the preparation of sections of «Identification A», «Identification B» and «Impurities» for national monograph «Immortelle flowers^N» to introduce into the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Keywords: Immortelle flowers, morphology, microscopy, standardization, monographs on herbal drugs, State Pharmacopoeia of Ukraine.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биологически активные вещества лекарственных растений / Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. — Новосибирск: Наука, Сиб. отд.-ние, 1990. — С. 218-221.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид., — Харків: PIPEГ, 2001. — 556 с.
3. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — С. 244-246.
4. Ruhrkrautbluten / Deutschen Arzneimittel-Codex. — Stuttgart: Deutsher Apotheker Verlag, Ergänzung. — Band II, 2000. — R-080.
5. Порівняльний аналіз методик визначення флавоноїдів у квітках цмину піскового / Мострянська Н.М., Котов А.Г., Котова Е.Е., Леонтьєв Д.Д. // Управління якістю в фармацевтиці: Матеріали VII Науково-практичної конференції, Харків, 17 травня 2013 р. / МОЗ України; Нац. фарм. ун-т. — Харків, 2013. — 180 с. — С. 95.
6. Котов А.Г. Фармакопейные аспекты стандартизации качества лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: автореф. дис. ... доктора фарм. наук: 15.00.03 / А.Г. Котов. — Харьков, 2013. — 40 с.
7. 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.
8. Визначник рослин УРСР. — Харків: Комуніст, 1950. — 928 с.
9. Визначник рослин України. — К.: Урожай, 1965. — 877 с.
10. Определитель высших растений Украины. — К.: Наукова думка, 1987. — 548 с.
11. Городнянская Л.М. Дикорастущие и культивируемые лекарственные растения, их диагностика и применение / Л.М. Городнянская, А.Г. Сербин, Н.М. Ткаченко и др. — Харьков: ХФИ, 1991. — С. 60-63.
12. Долгова А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. — М.: Медицина, 1977. — 275 с.
13. Муравьева Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. — М.: Медицина, 2002. — С. 427-429.
14. Wichtl M., Bisset N.G. Herbal drugs and Phytopharmaceuticals. 2nd ed. — Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 2001. — P. 257-260.
15. A. Judzientiene Chemical composition of the essential oils of wild (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench with differently colored inflorescences from eastern Lithuania / A. Judzientiene, R. Butkiene // Journal of Essential Oil Research, 2006. — Vol. 18. — P. 80-83.
16. WHO monographs on medicinal commonly used in the Newly Independent states (NIS). — Geneva: World Health Organization, 2010. — P. 175-185.
17. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в новых независимых государствах (ННГ). — Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2010. — С. 179-189.
18. Куркина А.В. Микроскопическое исследование цветков бессмертника песчаного / А.В. Куркина, М.В. Тарасенко, В.М. Рыжов // Медицинский альманах, 2010. — 4 (13). — С. 70-72.

Вовк Олександра Григорівна. Закінчила Харківський державний університет (1959). К.б.н. (1969). Доцент (1973). Провідний фахівець сектора експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Котова Еліна Едуардівна. Закінчила Харківський державний університет (1983). Завідувач сектора експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». К.фарм.н. (2005).

Котов Андрій Георгійович. Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). Заступник начальника відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Д.фарм.н. (2014).

Технологія лікарських засобів

УДК 615.453.625:615.244

Гуреєва С.М.

Публічне акціонерне товариство «Фармак»

Вибір допоміжних речовин з метою вдосконалення складу та технології виготовлення таблеток антралю, вкритих оболонкою

Обґрунтовано вибір допоміжних речовин з метою вдосконалення складу і технології виготовлення таблеток антралю, вкритих оболонкою, отриманих методом вологої грануляції. Оптимізацію складу таблеток антралю здійснювали з використанням методу математичного планування експерименту. Для проведення експериментальних досліджень з використанням чотирифакторного несиметричного дробового плану на основі «латинського паралелепіпеда» першого порядку відібрано 11 допоміжних речовин.

На основі здійсненого дисперсійного аналізу досліджено вплив якісних факторів і їх рівнів на основні показники якості таблеток мас і таблеток антралю. За результатами дослідження якісних факторів обрані такі допоміжні речовини: з групи наповнювачів — суміш магнію карбонату основного, мікрокристалічної целюлози (МКЦ 101) і крохмалю картопляного (1:1:1) (фактор a_3), з групи розпушувачів — кросповідон XL 10 (фактор b_1), серед зв'язуючих речовин — розчин повідону 29/32 (фактор c_3) і серед солюбілізаторів — полісорбат 80 (фактор d_2).

Ключові слова: метод вологої грануляції, таблетки антралю, вкриті оболонкою, допоміжні речовини, математичне планування, дисперсійний аналіз.

Вступ

Створення твердих лікарських форм з діючими речовинами, які мають малу розчинність та гідрофобну поверхню, є складною технологічною задачею. За фармако-технологічними показниками субстанція антраль не підходить для виготовлення таблеток методом прямого пресування, оскільки має дуже низький насипний об'єм та аморфну структуру частинок; прийнятним є метод вологої грануляції [1, 2].

Субстанція має гідрофобну поверхню, дуже погано змочується водою, тому для покращення процесу зволоження необхідно використовувати солюбілізатори, оскільки при недостатньому зволоженні поверхні субстанції під час технологічного процесу таблетки можуть розтріскуватися після пресування або під час нанесення полімерної оболонки [3].

Метою дослідження є оптимізація складу і технології виготовлення таблеток антралю для вдосконалення технологічного процесу.

Методи дослідження

Виготовлення таблеток-ядер антралю здійснювали методом вологої грануляції. Оптимізацію складу таблеток-ядер антралю здійснювали з використанням методу математичного планування. Для проведення експериментальних досліджень з використанням чотирифакторного несиметричного дробного плану на основі «латинського паралелепіпеда» першого порядку відібрано 11 допоміжних речовин [2, 3, 4, 5].

Для обчислення результатів експерименту використовували дисперсійний аналіз. Фармакологічні показники якості модельних таблеток мас і таблеток антралю, вкритих оболонкою, досліджували за допомогою методів і стандартних методик визначення відповідно до ДФУ: насипна густина, текучість, кут природного укусу, стійкість таблеток до роздавлювання, стираність [6].

Результати досліджень та їх обговорення

З метою оптимізації складу та технології виготовлення таблеток антралю, вкритих оболонкою, нами проведено вибір раціональних допоміжних речовин. Для цього досліджено три групи допоміжних речовин: наповнювачі, зв'язуючі речовини та солубілізатори.

Оскільки таблетки-ядра мають гідрофобну поверхню, було прийнято рішення вводити до їх складу солубілізатор для покращення змочування субстанції при зволоженні та поверхні ядра під час нанесення полімерної оболонки. В якості солубілізатора використовували полісорбат 80. Крім того, було вивчено вплив виду наповнювача, розпушувача та зв'язуючої речовини на основні показники якості гранул та таблеток антралю.

В Табл. 1 наведено перелік факторів та їх рівнів для вдосконалення складу та технології

виготовлення таблеток антралю. Кожна серія дослідів була реалізована в 2 повторностях, що дало можливість зменшити помилку експерименту та встановити взаємодію між рівнями факторів. Дисперсійний аналіз експериментальних даних показав, що на вільну насипну густину гранул впливають усі лінійні фактори та їх взаємодії. Вплив факторів і їх парних взаємодій на цей показник якості гранул антралю можна ранжувати таким рядом: $C > CD > D > > BD > A > B > AD$. Найбільш суттєвий вплив на вільну насипну густину проявляє природа зв'язуючих речовин; як видно з ряду переваг, вплив розчинів гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ) та повідону перевищує вплив крохмального клейстеру: $c_2 \geq c_3 > c_1$.

На другому місці за впливом знаходиться взаємодія зв'язуючих речовин і солубілізатора.

Для рівнів фактора А отримали такий ряд переваг: $a_1 > a_2 > a_3$. При використанні суміші магію карбонату основного (МКО) і крохмалю картопляного вільна насипна густина має найбільше значення, а суміші мікрокристалічної целюлози і крохмалю картопляного — найменше. Вплив факторів та їх парних взаємодій на вільну насипну густину гранул після усадки можна розмістити в такій послідовності: $C > CD > > D > BD > A > AD > res > B$. На цей показник також найбільше впливає вид зв'язуючих речовин: $c_2 \geq c_3 > c_1$.

Матриця планування експерименту за «латинським паралелепіпедом» першого порядку і результати дослідження таблеток мас і таблеток антралю наведені в Табл. 2.

Вплив розчинів ГПМЦ та повідону був рівнозначним, а крохмальний клейстер виявився гіршим для насипної густини гранул антралю. Знову ж таки, кращими були таблеткові маси при наявності солубілізатора, ніж без нього.

Таблиця 1

Фактори і їх рівні, які вивчені з метою вдосконалення складу таблеток-ядер антралю

Фактори	Рівні факторів
А — наповнювачі	a_1 — магній карбонат основний важкий (МКО) + крохмаль картопляний (1:2); a_2 — МКЦ 101 + крохмаль картопляний (1:2); a_3 — суміш МКО, МКЦ 101 + крохмаль картопляний (1:1:1).
В — розпушувачі	b_1 — кросповідон XL 10; b_2 — крохмаль гліколят натрію; b_3 — натрію кроскармелоза.
С — зв'язуючі речовини	c_1 — 3% крохмальний клейстер; c_2 — 5% розчин ГПМЦ Е 5; c_3 — 7% розчин повідону 29/32.
Д — солубілізатори	d_1 — без солубілізатора; d_2 — полісорбат (твін) 80 — 1 %.

Таблиця 2

Чотирифакторний несиметричний дробний план на основі «латинського паралелепіеда» першого порядку і результати дослідження з метою вдосконалення таблеток-ядер антралю

	A	B	C	D	y_1	y'_1	y_2	y'_2	y_3	y'_3	y_4	y'_4	y_5	y'_5	y_6	y'_6	y_7	y'_7	y_8	y'_8
1	a_1	b_1	c_3	d_1	0.387	0.389	0.486	0.482	2.59	2.57	39.2	39.5	4	5	119.0	111.0	0.26	0.22	5.5	5.0
2	a_1	b_2	c_2	d_1	0.459	0.456	0.563	0.558	4.78	4.72	38.8	38.6	4	4	82.0	80.0	0.15	0.17	2.1	2.5
3	a_1	b_3	c_1	d_1	0.326	0.329	0.433	0.438	0.69	0.67	36.1	36.4	2	3	61.0	65.0	0.87	0.98	4.5	3.3
4	a_2	b_1	c_1	d_1	0.281	0.285	0.389	0.393	0.62	0.65	31.5	31.7	2	3	65.2	74.2	0.57	0.66	8.0	9.0
5	a_2	b_2	c_3	d_1	0.419	0.416	0.540	0.544	1.60	1.65	40.4	40.2	4	5	96.0	97.0	0.24	0.20	5.1	5.5
6	a_2	b_3	c_2	d_1	0.420	0.424	0.540	0.545	1.71	1.78	37.5	37.9	4	5	108.0	113.0	0.27	0.22	3.0	3.3
7	a_3	b_1	c_2	d_1	0.413	0.410	0.533	0.527	1.27	1.29	39.1	39.3	4	5	93.0	90.0	0.29	0.22	1.1	1.5
8	a_3	b_2	c_1	d_1	0.305	0.309	0.419	0.416	1.14	1.18	36.2	36.0	2	3	65.8	61.8	0.49	0.55	9.2	10.2
9	a_3	b_3	c_3	d_1	0.419	0.416	0.535	0.531	1.56	1.51	37.9	37.6	4	5	90.0	92.0	0.29	0.23	5.3	5.0
10	a_1	b_1	c_1	d_2	0.387	0.393	0.578	0.573	1.23	1.26	35.6	35.3	3	4	63.0	66.0	1.40	1.11	1.0	1.1
11	a_1	b_2	c_3	d_2	0.448	0.443	0.565	0.560	1.44	1.49	37.9	37.5	4	5	114.0	118.0	0.33	0.30	5.2	5.4
12	a_1	b_3	c_2	d_2	0.417	0.413	0.545	0.541	1.49	1.46	38.8	38.6	4	5	94.1	91.1	0.44	0.40	4.3	4.5
13	a_2	b_1	c_2	d_2	0.407	0.402	0.539	0.536	0.98	0.89	36.1	36.3	5	5	89.8	94.8	0.48	0.44	2.0	1.5
14	a_2	b_2	c_1	d_2	0.362	0.368	0.475	0.472	0.98	0.95	35.3	35.6	3	3	90.0	93.0	0.49	0.46	6.5	6.4
15	a_2	b_3	c_3	d_2	0.378	0.383	0.477	0.479	1.69	1.60	36.2	36.4	4	4	107.0	109.0	0.28	0.24	7.2	6.5
16	a_3	b_1	c_3	d_2	0.439	0.435	0.554	0.550	2.19	2.15	35.7	35.9	5	5	109.0	114.0	0.36	0.34	6.3	6.5
17	a_3	b_2	c_2	d_2	0.391	0.395	0.499	0.496	1.46	1.37	36.9	36.5	5	5	99.0	102.0	0.24	0.25	4.2	5.5
18	a_3	b_3	c_1	d_2	0.379	0.376	0.511	0.516	1.19	1.09	33.5	33.8	5	5	91.0	94.0	0.46	0.49	4.0	4.5

Примітки:

- y_1 і y'_1 — насипна густина вільна, у грамах на мілілітр;
- y_2 і y'_2 — насипна густина після усадки, у грамах на мілілітр;
- y_3 і y'_3 — текучість, у грамах на секунду;
- y_4 і y'_4 — кут природного відхилу, у градусах;
- y_5 і y'_5 — процес пресування, бали;
- y_6 і y'_6 — стійкість до роздавлювання, кН;
- y_7 і y'_7 — стираність, у відсотках;
- y_8 і y'_8 — розпадання, у хвилинах.

Вплив вивчених наповнювачів має таку ж закономірність для цього показника, як і в попередньому випадку. Тобто, на першому місці вплив фактора a_1 , а на останньому — фактора a_3 .

При порівнянні розпушувачів (фактор B) отримали такий ряд переваг: $b_1 > b_2 > b_3$. Кросповідон XL 10 має суттєву перевагу над іншими випробовуваними зразками.

На текучість гранул антралю досліджувані фактори та їх парні взаємодії впливають таким чином: $C > CD > A > AD > BD > D > res > B$.

Знову визначальним був вплив зв'язуючих речовин та їх взаємодії із солюбілізатором. На третьому місці був вплив виду наповнювача, і на останньому — вид розпушувача. Серед зв'язуючих речовин кращими виявилися розчин ГПМЦ і розчин повідону, гіршим — крохмальний клейстер. Серед наповнювачів на першому місці — суміш МКО і крохмалю картопляного, а на останньому — суміш мікрокристалічної целюлози (МКЦ 101) та крохмалю картопляного.

За впливом на значення кута природного укусу гранул антралю фактори розташовуються в такій послідовності: $C > D > res >$

$> A > CD > B > AD > BD$. Найбільш суттєвий вплив на кут природного укусу проявляє вид зв'язуючих речовин і наявність чи відсутність солюбілізатора, а найменший — взаємодія розпушувача і солюбілізатора. Найкращу текучість мали таблеткові маси антралю із кросповідоном XL 10 та полісорбатом 80 у складі. Серед наповнювачів — суміш МКО та крохмалю картопляного.

За ступенем впливу на процес пресування таблеток антралю лінійні фактори та їх парні взаємодії можна розташувати в такій послідовності: $C > D > CD > A$ при статистичній незначущості B, AD, BD і res.

Вплив вивчених факторів на процес пресування відображали у вигляді стовпчикових діаграм. На Рис. 1 показано вплив наповнювачів на процес пресування.

Аналіз стовпчикової діаграми показує, що найкращий результат мають таблетки з сумішшю МКО з МКЦ та крохмалем картопляним 1:1:1.

На Рис. 2 показано вплив наявності солюбілізатора в складі таблеток на процес пресуван-

ня. Як видно з рисунка, набагато краще пресуються таблетки із солюбілізатором у складі, ніж без нього.

На стійкість таблеток до роздавлення впливають три лінійні фактори (фактор В статистично незначущий) та три парних взаємодії. Ряд переваг має такий вигляд: $C > D > BD = ges > AD = CD = A$. Тобто, вид розпушувача не впливає на стійкість таблеток до роздавлення.

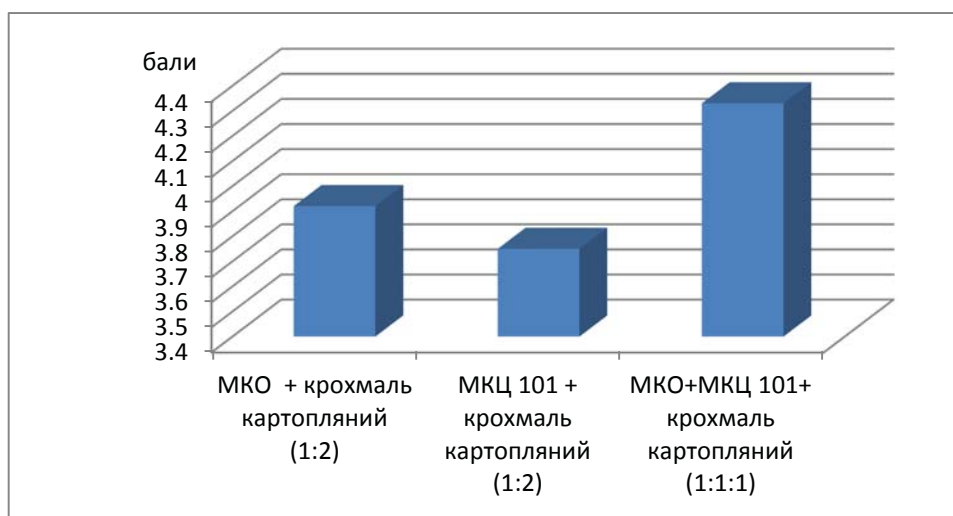
Найбільший вплив мають вид зв'язуючої речовини і солюбілізатора та взаємодія розпушувача із солюбілізатором. Вплив інших факторів та їх взаємодія мають однакове значення.

Серед рівнів фактора С можна побудувати такий ряд переваг: $c_3 > c_2 > c_1$. Розчин повідону має суттєву перевагу над розчином ГПМЦ та крохмальним клейстером. Ця закономірність показана за допомогою стовпчикової діаграми на Рис. 3.

При порівнянні солюбілізаторів (фактор D) отримали такий ряд переваг: $d_2 > d_1$; таблетки з солюбілізатором мають кращу стійкість до роздавлення, ніж без солюбілізатора.

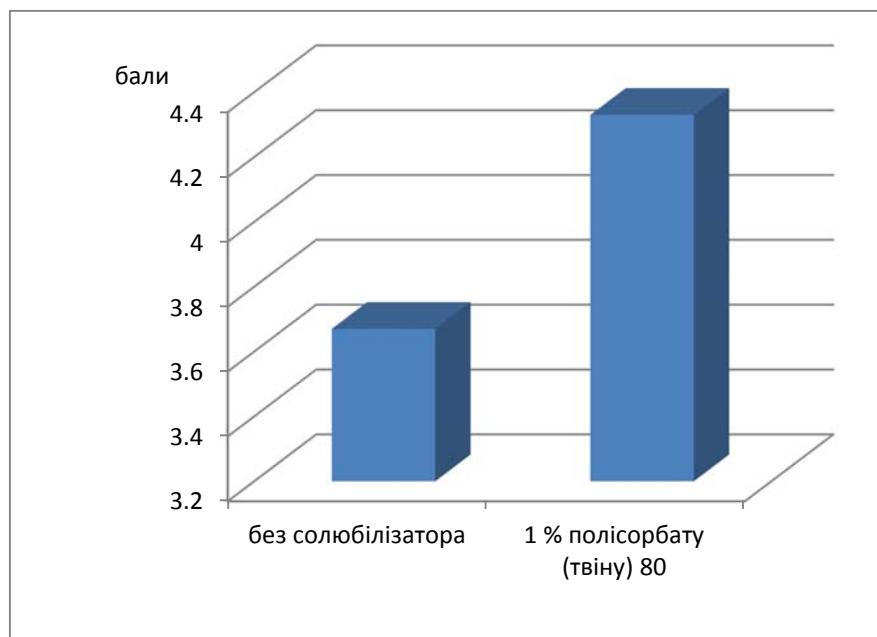
На Рис. 4 зображена стовпчикова діаграма, що ілюструє вплив солюбілізаторів на стійкість таблеток до роздавлення. Аналіз рисунка по-

Рисунок 1



Вплив виду наповнювача на оцінку процесу пресування таблеток-ядер антралю

Рисунок 2



Вплив виду солюбілізатора на оцінку процесу пресування таблеток-ядер антралю

казує, що за наявності солюбілізатора стійкість таблеток до роздавлювання набагато більша.

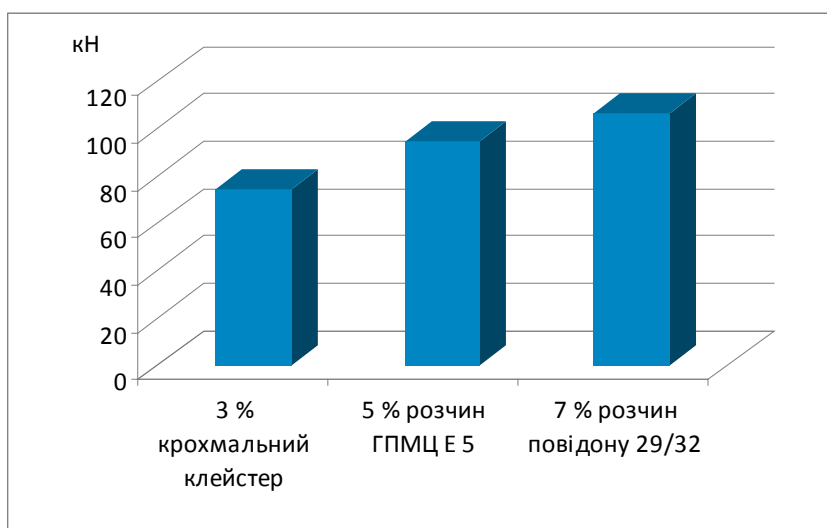
Дисперсійний аналіз експериментальних даних показав, що вплив факторів і їх парних взаємодій на стіраність можна ранжувати таким рядом: $C > D > BD > res > AD > CD > A$ при статистичній незначущості фактора В. На стіраність таблеток-ядер антралю найбільше впливає вид зв'язуючої речовини і солюбілізатора, найменше — вид наповнювача. Вплив розпушувачів виявився незначущим. Вплив вивчених зв'язуючих речовин (фактор С) на стіраність таблеток антралю можна ранжувати таким рядом: $c_3 > c_2 > c_1$. Розчин повідону має суттєву перевагу над іншими випробовуваними зразками речовин з цієї групи. На Рис. 5 зо-

бражений вплив виду зв'язуючої речовини на цей показник якості. Тобто, при використанні розчину повідону стіраність таблеток має найменшу величину.

При порівнянні наповнювачів (фактор А) отримали такий ряд переваг: $a_3 > a_2 > a_1$. Суміш трьох використаних наповнювачів 1:1:1 має суттєву перевагу перед двокомпонентними сумішами наповнювачів за впливом на стіраність таблеток антралю.

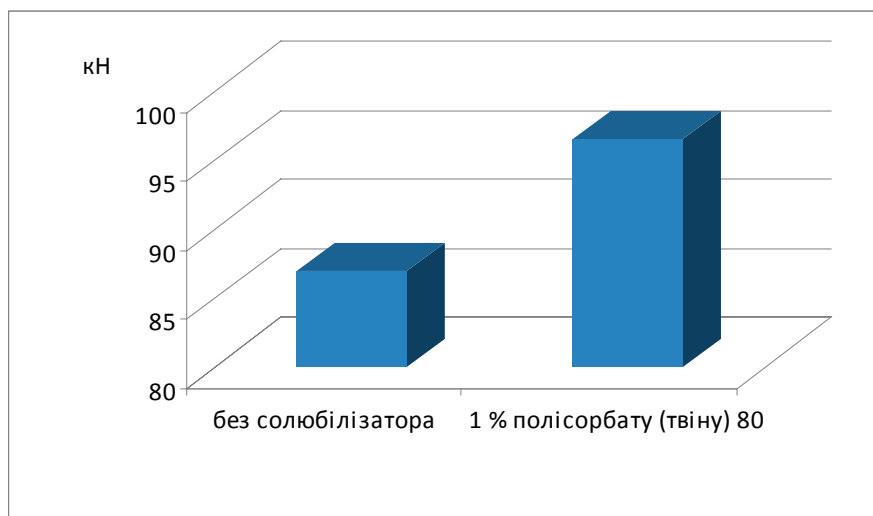
За впливом на швидкість розпадання таблеток антралю вивчені фактори та їх парні взаємодії можна представити таким рядом переваг: $C > CD = A > res > B > BD > D$. Найбільш суттєвий вплив на здатність таблеток антралю

Рисунок 3



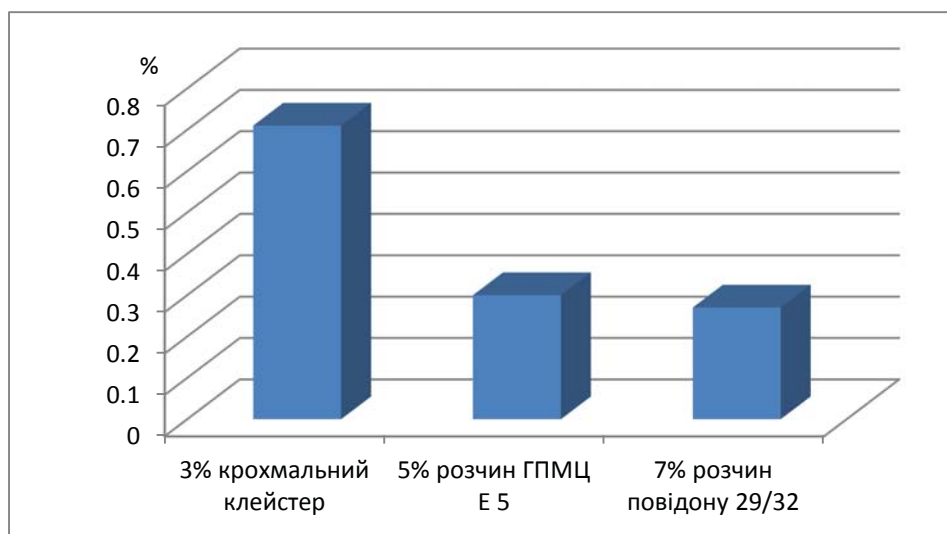
Вплив виду зв'язуючої речовини на стійкість таблеток-ядер антралю до роздавлювання

Рисунок 4



Вплив солюбілізаторів на стійкість таблеток-ядер антралю до роздавлювання

Рисунок 5



Вплив зв'язуючих речовин на стиранисть таблеток-ядер антралю

до розпадання має вид зв'язуючої речовини та її взаємодія з солюбілізатором.

При порівнянні розпушувачів (фактор В) отримали такий ряд переваг: $b_1 > b_3 > b_2$. Кросповідон XL 10 має суттєву перевагу над іншими видами розпушувачів.

Для солюбілізаторів — найкращі результати щодо розпадання таблеток антралю отримано при використанні солюбілізатора, ніж без нього.

Висновок

На основі здійсненого дисперсійного аналізу досліджено вплив якісних факторів та їх рівнів на основні показники якості таблеткових мас та таблеток-ядер антралю. За результатами дослідження якісних факторів обрано такі допоміжні речовини: з групи наповнювачів — суміш МКО, МКЦ 101 і крохмалю картопляного (1:1:1) (фактор a_3), з групи розпушувачів — кросповідон XL 10 (фактор b_1), серед зв'язуючих речовин — розчин повідону 29/32 (фактор c_3) і серед солюбілізаторів — полісорбат 80 (фактор d_2).

ЛІТЕРАТУРА

- Гуреєва С.М. Дослідження асортименту допоміжних речовин, які використовують в лікарських засобах, що зареєстровані на території України. Повідомлення 2. Дослідження асортименту допоміжних речовин, які використовують у виробництві таблеток-ядер з оболонкою / С.М. Гуреєва, М.Б. Демчук, Т.А. Грошовий // Фармацевтичний часопис. — 2013. — № 1 (25). — С. 63-68.
- Васенда М.М. Сучасний стан створення, виробництва та дослідження таблетованих лікарських препаратів / Васенда М.М. [та ін.] // Фармацевтичний часопис. — 2009. — № 4 (12). — С.77-80.
- Деклараційний патент на корисну модель № 65450 Україна А 61К 9/20 (2006.01), А 61К 31/122 (2006.01), А 61К 33/06 (2006.01), А 61Р 1/16 (2006.01) Тверда лікарська форм-

ма, яка має гепатопротекторну дію / Жебровська Ф.І., Костюк Г.В., Гуреєва С.М. Заявл.: 12.12.2011, опубл. 12.12.2011, бюл. № 23/ 2011.

4. Математичне планування експерименту при проведенні наукових досліджень в фармації / За заг. ред. Грошового Т.А. — Тернопіль: ТДМУ, 2008. — 368 с.

5. Гуреєва С.М. Використання методів математичного планування для підбору оптимальної композиції полімерної оболонки таблеток «Антраль» / С.М. Гуреєва // Фармацевтичний журнал. — 2012. — № 2. — С. 69-72.

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

УДК 615.453.625:615.244

Резюме

Гуреєва С.Н.

Публичное акционерное общество «Фармак»

Выбор вспомогательных веществ с целью усовершенствования состава и технологии изготовления таблеток антраля, покрытых оболочкой

Обоснован выбор вспомогательных веществ с целью усовершенствования состава и технологии изготовления таблеток антраля, покрытых оболочкой, полученных методом влажной грануляции. Оптимизацию состава таблеток антраля осуществляли с использованием метода математического планирования эксперимента. Для проведения экспериментальных исследований с использованием четырехфакторного несимметричного дробного плана на основе «латинского параллелепипеда» первого порядка отобрано 11 вспомогательных веществ.

На основе осуществленного дисперсионного анализа исследовано влияние качественных факторов и их уровней на основные показатели качества таблеточных масс и таблеток антраля. По результатам исследования качественных факторов выбраны следующие вспомогательные вещества: из группы наполнителей — смесь магния карбоната основного, микрокристаллической целлюлозы (МКЦ 101) и крахмала картофельного (1:1:1) (фактор a_3), из группы разрыхлителей — кросповідон XL 10 (фактор b_1), из связывающих веществ — раствор пovidона 29/32 (фактор c_3) и среди солюбилизаторов — полисорбат 80 (фактор d_2).

Ключевые слова: метод влажной грануляции, таблетки антраля, покрытые оболочкой, вспомогательные вещества, математическое планирование, дисперсионный анализ.

UDC 615.453.625:615.244

Summary

Gureyeva S.M.

Farmak Joint-Stock Company, Ukraine

Choice of excipients with the aim of perfection of composition and technology of tablets Antral, tunicate

With the aim of optimization of composition and technology of tablets of Antral, tunicate, we are conduct the choice of rational excipients. For this purpose, three groups of auxiliary substances are investigational: fillers relating and solubilisator.

As tablets have a hydrophobic surface, was made decision to enter solubilisator in their composition, for the improvement of moistening of substance at moistening and surface of kernel during causing of polymeric shell. As solubilisator used polysorbat 80. Influence of type of fillers, scarifies and relating substances was in addition, studied on the basic indexes of quality of granules and tablets.

In the research, the choice of excipients is reasonable with the aim of perfection of composition and technology of tablets Antral, tunicate, got the method of moist granulation. Optimization of composition of tablets of Antral was carried

out with the use of method of the mathematical planning. For realization of experimental researches with the use of four factor asymmetrical plan based on Latin to the parallelepiped of first-order 11 excipients are selected.

Based on realizable analysis of variance influence of quality factors and their levels is investigational on the basic indexes of quality of the tablets masses and tablets Antral. On results research of quality factors next excipients are select: from the group of fillers: mixture of magnesium sub carbonate (MSC), microcrystalline cellulose (MCC) 101 and potato starch (1:1:1) is a factor a_3 , from the group of scarifies — crospondone XL 10 (factor b_1), among relating substances is solution of povidone 29/32 (factor c_3) and among solubilisators — polysorbat 80 (factor d_2).

Keywords: method of moist granulation, tablets Antral, tunicate, excipients, mathematical planning, analysis of variance.

Гурєєва Світлана Миколаївна. К.фарм.н. (1992), начальник центральної лабораторії дослідних та експериментальних робіт ПАТ «Фармак» (з 2008).

УДК 615.457.1: 617.741-004.1

Сиденко Л.Н.

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

Фармацевтическая разработка глазных капель азапентацен 0.015 %: обоснование состава и выбор фильтрующих материалов

Показана целесообразность создания глазных капель на основе азапентацена, разработанных с учетом хиноидной теории формирования катаракт. Проведен комплекс экспериментальных исследований по изучению физико-химических и технологических свойств лекарственного вещества азапентацен. Установлено, что порошок азапентацен легко растворим в воде, чувствителен к повышенной влажности и повышенной температуре. Относительная влажность при хранении должна составлять не более 22.5 %. В результате изучения влияния pH среды на показатели качества 0.015 % раствора азапентацена обоснована область pH от 7.1 до 7.8 с точки зрения химической стабильности и комфортности для глаза. Изучена совместимость различных фильтрующих мембран с раствором глазных капель азапентацена в статических и в динамических условиях. Установлено, что на мембране из нейлона типа Posidune и Ultipor фирмы Pall происходит сорбция лекарственного вещества. Определены оптимальные фильтрующие материалы для процесса фильтрации глазных капель азапентацена: поливинилдендифторид и полиэфирсульфон.

Ключевые слова: глазные капли, азапентацен, физико-химические свойства, pH, фильтрующие мембраны, катаракта.

В офтальмологии среди многочисленных заболеваний органа зрения особое место занимает катаракта (помутнение хрусталика). Она является наиболее частой причиной слабости зрения и слепоты в мире и рассматривается как медико-социальная проблема [1]. По данным ВОЗ, более чем у 17 млн человек во всем мире снижение зрения связано с катарактой [2]. Начальные признаки возрастной катаракты отмечаются у (64-68) % пациентов в возрасте 60 лет и старше [1, 3].

Эффективным и радикальным методом восстановления зрения при катарактах является микрохирургия [4]. Однако при начальных катарактах, особенно при достаточно высокой остроте зрения, основным методом медицинской помощи остается терапевтическое лечение [4, 5].

В настоящее время для нормализации обменных процессов в хрусталике фармацевтическими фирмами и лабораториями ряда стран предложено более 60 препаратов [6], среди которых глазные капли «Квинакс», разработанные с учетом хиноидной теории формирования катаракт и содержащие в качестве активного фармацевтического ингредиента азапентацен.

Азапентацен — синтетическое производное феноксазона. Его основное фармакологическое действие состоит в угнетении реакции между производными хинона и растворимыми протеинами, приводящей к помутнению хрусталика. Азапентацен стимулирует протеолитические ферменты, содержащиеся в водянистой влаге передней камеры глаза. Предохраняет сульфгидрильные группы белков хрусталика

от окисления и способствует рассасыванию непрозрачных комплексов [7]. По данным [8], глазные капли азапентацена являются наиболее эффективными относительно заднекапсулярных катаракт, при лечении которых в ряде случаев наблюдается регресс и даже полное рассасывание помутнений хрусталика.

В Украине глазные капли на основе азапентацена не выпускаются; зарегистрирован препарат «Квинакс», по 15 мл во флаконах-капельницах, производства Alcon-Souventeur (Бельгия) [7]. Неуменшающаяся потребность в препаратах антикатарактального действия, относительная дешевизна готовой лекарственной формы отечественного производства на основе азапентацена по сравнению с глазными каплями «Квинакс» указывают на целесообразность ее создания и производства.

Целью настоящей работы является научное обоснование состава глазных капель азапентацен 0.015 %, выбор оптимального фильтрующего материала, материалов первичной упаковки на стадии фармацевтической разработки препарата.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований являлись:

- субстанция (5,12)-игидроазапентацендисульфоновой кислоты натриевая соль производства фирмы Shanghai Medper Co., Ltd., Китай;
- вспомогательные вещества (кислота борная, натрия тетраборат [9], калия хлорид, 1 М раствор натрия гидроксида [10], вода для инъекций [11]);
- глазные капли азапентацена 0.015 %;
- фильтровальные мембраны с размером пор 0.2, 2.0 и 4.5 мкм на основе следующих материалов: поливинилидендифторид, Durapore, производства Millipore, США, и Fluorodyne® II (Pall), Германия; полиэфирсульфон, PROPOR PES, производства Domnick Hunter Ltd, Великобритания; нейлон, Posidyne, Ultipor (Pall), Германия, и полипропилен (Pall), Германия.

В ходе научно-исследовательских работ проводился качественный и количественный контроль образцов препарата. В качестве показателей, характеризующих стабильность глазных капель, исследовали прозрачность, pH, содержание механических включений, количественное содержание лекарственного вещества. Для оценки качества препарата использовали следующие методы: визуальный (ГФУ, 2.2.1), потенциометрический (ГФУ, 2.2.3), гравиметри-

ческий и метод УФ-спектрофотометрии (ГФУ, 2.2.25) [9].

Изучение химической совместимости раствора препарата и фильтрующих материалов проводили в статических (методом экспозиции мембран в раствор препарата) и динамических (методом фильтрации раствора глазных капель через выбранные фильтрующие мембраны) условиях.

В первом случае в приготовленные образцы препарата на 24 ч при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ помещали один из видов фильтрующих мембран (по три параллельных опыта) в соотношении 1:1, то есть на 1 см^2 фильтрующего материала приходился 1 мл испытуемого раствора. При проведении этих исследований контролировали показатели качества растворов до и после контакта с перечисленными выше фильтрующими материалами. Продолжительность исследования выбрана с учетом возможной продолжительности процесса фильтрации в производственных условиях, что соответствует времени контакта раствора с фильтрующим материалом.

Во втором случае фильтрующую мембрану диаметром 47 мм и площадью фильтрации 13.8 см^2 помещали в держатель фильтра типа «Суиннекс» фирмы Millipore и по 100 мл растворов препарата последовательно пропускали через систему фильтров предварительной (размер пор — 4.5 и 2.0 мкм) и стерилизующей (размер пор — 0.2 мкм) фильтрации с помощью шприца (фирма Millipore).

Результаты исследований и их обсуждение

Для выбора оптимального состава и получения стабильных глазных капель на первом этапе фармацевтической разработки [12] нами исследованы физико-химические и технологические свойства лекарственного вещества и вспомогательных веществ, которые входят в состав препарата. Азапентацен не описан в ведущих фармакопеех мира, его качество соответствует требованиям DMF фирмы-производителя [13].

Натрия азапентацен полисульфонат ($\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$, М.м. 488.4) — кристаллический порошок черно-зеленого цвета с блеском. Азапентацен представляет собой соль сильной кислоты и сильного основания. В водных растворах азапентацен полисульфонат натрия может диссоциировать на положительно заряженные ионы натрия и отрицательно заряженный азапентацен полисульфонат ион. Кислая среда (pH раствора от 7.0 и ниже) будет способствовать образованию 5,12-дигидроазапентацендисульфоновой кислоты, щелочная среда — разложе-

нию азапентацена на исходные ингредиенты (Рис. 1).

Согласно требованиям, предъявляемым к глазным каплям, а также к лекарственному веществу, при разработке препарата критичными для качества препарата физико-химическими характеристиками лекарственного вещества натрия азапентацен полисульфоната являются: растворимость, количественное содержание вещества, потеря в массе при высушивании, сопутствующие примеси.

При изучении показателя качества субстанции «Растворимость» было установлено, что натрия азапентацен полисульфонат легко растворим в воде (1:10), что соответствует 10 % раствору. Концентрация лекарственного вещества гораздо ниже этого значения, что делает возможным разработку глазных капель в виде 0.015 % раствора.

Азапентацен является гигроскопичным веществом. Нами было изучено влияние влажности воздуха на содержание воды в субстанции. Для определения адсорбирования влаги из воздуха образцы помещали в закрытые сосуды, в которых воздух был насыщен физиологическим раствором (RH, 75 %, 25 °C) и насыщенным раствором калия ацетата (RH, 22.5 %, 25 °C). Образцы взвешивали в начале эксперимента (0 ч), затем через 24 и 48 ч. Было показано, что азапентацен чувствителен к повышенной влажности и легко адсорбирует влагу из воздуха. Относительная влажность при хранении должна составлять не более 22.5 %. Повышение влажности будет спо-

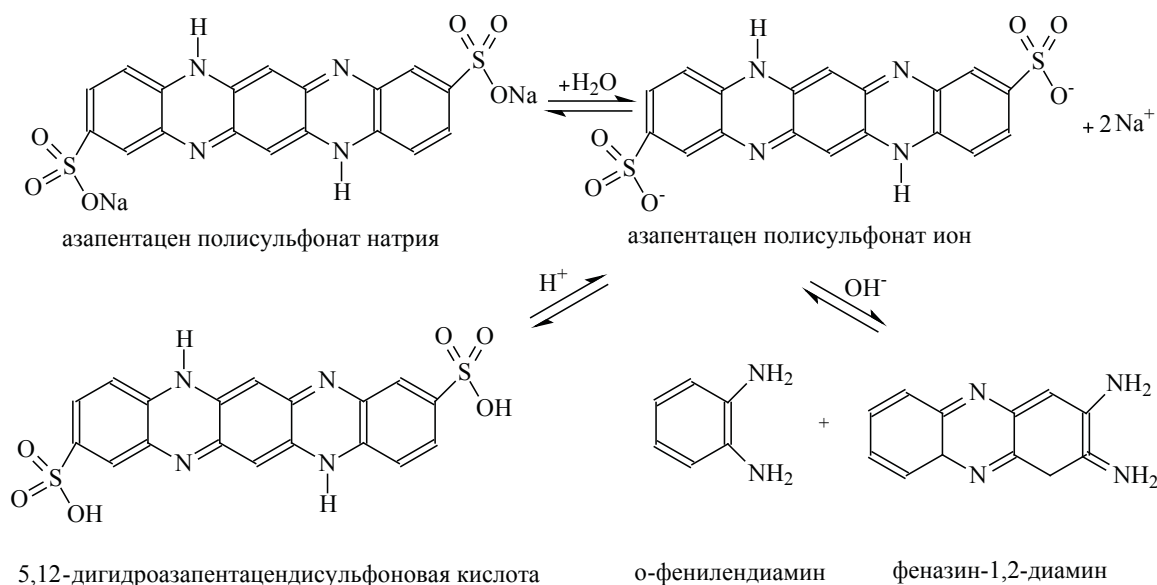
собствовать накоплению влаги, что повлияет на показатель качества субстанции и вследствие этого станет невозможным ее использование для дальнейших исследований.

Нами также изучено влияние температуры на стабильность азапентацена: 1 % раствор азапентацена выдерживали при 25, 60, 65, 70, 80, 85 и 90 °C и анализировали через 0, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ч соответственно. Установлено, что азапентацен чувствителен к повышенной температуре, поэтому более стабилен при хранении в прохладном месте (срок хранения 0.015 % водного раствора при температуре ниже 4 °C — 2 года, при комнатной температуре (25 °C) — 90 дней).

Натрия азапентацен полисульфонат является фоточувствительным веществом. Поэтому технологический процесс приготовления раствора необходимо проводить в светозащитной емкости.

Основным физическим показателем глазных капель, характеризующим стабильность и фармако-терапевтическую активность лекарственного вещества, а также комфортность препарата при применении, является pH. Для обоснования области pH глазных капель было изучено влияние pH среды на показатели качества 0.015 % раствора азапентацена. Результаты исследований, представленные в предыдущей нашей работе [14], показали, что наиболее приемлемой с точки зрения химической стабильности и комфортности для препарата на основе азапентацена будет являться область pH от 7.1 до 7.8. Согласно экспериментальным данным,

Рисунок 1



Равновесные процессы в водных растворах натрия азапентацена полисульфоната в зависимости от pH среды

значение pH субстанции азапентацена составляет 6.4-6.7. Исходя из вышесказанного, для обеспечения выбранной области pH препарата необходимо введение в раствор буферных ингредиентов. Для поддержания необходимого значения pH в офтальмологических растворах азапентацена используют боратную буферную систему и 1 М раствор натрия гидроксида [7]. Необходимо отметить, что данный буфер в выбранной области pH имеет максимальную буферную емкость. Выбор необходимого количества компонентов боратного буфера осуществлен также с учетом их влияния на осмолярность препарата. Теоретически рассчитанное значение осмолярности боратного буферного раствора составляет 104.25 мосмоль/л.

Комфортность глазных капель при применении обеспечивается концентрацией ионов водорода и осмотическим давлением, значения которых должны быть аналогичными соответствующим показателям слезной жидкости или находиться в диапазоне значений, определяемых как «обеспечивающие комфортность» [9]. Для достижения необходимого показателя осмолярности нами выбран калия хлорид, как и в референтном препарате «Квинакс». Концентрация калия хлорида рассчитана исходя из разницы между значением осмолярности

300 мосмоль/л и суммой значений осмолярности, создаваемых растворенными веществами. Рассчитанная теоретически осмолярность глазных капель азапентацен 0.015 % приближена к величине осмолярности слезной жидкости и составляет 296.86 мосмоль/л.

Методом УФ-спектрофотометрии показана химическая совместимость азапентацена со вспомогательными веществами. Результаты исследований по валидации аналитических методик и стабильности препарата в процессе хранения свидетельствуют об отсутствии химического взаимодействия между азапентаценом и вспомогательными веществами.

Разработанный препарат «Азапентацен», 0.015 % глазные капли, отличается от референтного препарата «Квинакс» только отсутствием антимикробных консервантов: метилпарагидроксибензоата, пропилпарагидроксибензоата и тиомерсала. Отсутствие антимикробных консервантов объясняется объемом содержимого контейнера, составляющим 1 мл. Такой объем первичной упаковки был выбран на основании микробиологической стабильности глазных капель в процессе применения в течение 3 суток, что было установлено при изучении эффективности антимикробных консервантов. Согласно инструкции по медицинскому применению, до-

Таблица 1

Влияние различных фильтрующих материалов на показатели качества раствора азапентацена 0.015 % в статических/динамических условиях

Фильтрующий материал	Показатель/нормирование		
	pH (7.1-7.8)	Прозрачность (должен быть прозрачным)	Количественное содержание азапентацена, мг/мл (0.135-0.165)
Исходный раствор	7.51	прозрачен	0.161
Durapore®, Millipore	7.49/7.50	прозрачен	0.161/0.160
Fluorodyne® II, Pall	7.49/7.51	прозрачен	0.159/0.158
PROPOR PES, Domnick hunter Ltd.	7.50/7.51	прозрачен	0.160/0.161
Posidyne, Pall	7.50/7.50	прозрачен	0.150/0.149
Ultipor, Pall	7.48/7.49	прозрачен	0.158/0.156
Полипропилен, Pall	7.51/7.50	прозрачен	0.157/0.159

Таблица 2

Влияние фильтрующего материала (нейлон) на показатели качества раствора азапентацена 0.015 %

Показатель	Исходное значение	Раствор после фильтрации
Внешний вид	прозрачная жидкость пурпурно-красного цвета	прозрачная жидкость пурпурно-красного цвета
pH (7.1-7.8)	7.58	7.56
Механические включения (должны отсутствовать)	отсутствие	отсутствие
Количественное содержание азапентацена, мг/мл (0.135-0.165)	0.161	0.140

Таблица 3

Результаты анализа препарата «Азапентацен», 0.015 % глазные капли, в процессе хранения при температуре от 8 °С до 25 °С

№ серии	Дата анализа и переконтроля	Описание	Идентификация				Прозрачность	рН	Объем содержимого упаковки	Стерильность	Механические включения	Количество в держании, мг/мл	Срок хранения	Вывод													
			азапентацен	натрий	калий	хлориды																					
Требования проекта МКК		прозрачная жидкость пурпурно-красного цвета	УФ-спектр: максимум поглощения (293 ± 2) нм	характерная реакция (b)	характерная реакция (b)	характерная реакция (a)	Должен быть прозрачным	7.1-7.8	не менее 1 мл	Должен быть стерильным	Должен выдерживать требования РД 64-076-89	от 0.135 до 0.165	2 года														
															010707	30.07.07	прозрачная	положительная	положительная	прозрачн.	7.4	соответ.	стерильн.	выдерживает	0.152	-	пригоден
																30.10.07	жидкость	"-	"-	"-	7.4	"-	"-	"-	0.152	3 мес.	"-
																28.01.08	жидкость	"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.151	6 мес.	"-
																29.04.08	пурпурно-красного	"-	"-	"-	7.4	"-	"-	"-	0.152	9 мес.	"-
																29.07.08	цвета	"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	1 г	"-
																30.01.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.151	1 г 6 мес.	"-
																30.07.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.150	2 г	"-
																30.10.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.150	2 г 3 мес.	"-
																30.10.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.150	2 г 3 мес.	"-
020707		прозрачная жидкость пурпурно-красного цвета	положительная	положительная	положительная	прозрачн.	7.3	соответ.	стерильн.	выдерживает	0.148	-	пригоден														
															30.07.07	прозрачная	"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.149	3 мес.	"-	
															30.10.07	жидкость	"-	"-	"-	7.4	"-	"-	"-	0.148	6 мес.	"-	
															28.01.08	жидкость	"-	"-	"-	7.4	"-	"-	"-	0.148	9 мес.	"-	
															29.04.08	пурпурно-красного	"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.149	1 г	"-	
															29.07.08	цвета	"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.148	1 г 6 мес.	"-	
															30.01.09		"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.147	2 г	"-	
															30.07.09		"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.147	2 г 3 мес.	"-	
															30.10.09		"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.147	2 г 3 мес.	"-	
															30.10.09		"-	"-	"-	7.3	"-	"-	"-	0.147	2 г 3 мес.	"-	
030707		прозрачная жидкость пурпурно-красного цвета	положительная	положительная	положительная	прозрачн.	7.6	соответ.	стерильн.	выдерживает	0.153	-	пригоден														
															30.07.07	прозрачная	"-	"-	"-	7.6	"-	"-	"-	0.153	3 мес.	"-	
															30.10.07	жидкость	"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.153	6 мес.	"-	
															28.01.08	жидкость	"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	9 мес.	"-	
															29.04.08	пурпурно-красного	"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	1 г	"-	
															29.07.08	цвета	"-	"-	"-	7.6	"-	"-	"-	0.153	1 г 6 мес.	"-	
															30.01.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.153	1 г 6 мес.	"-	
															30.07.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	2 г	"-	
															30.10.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	2 г 3 мес.	"-	
															30.10.09		"-	"-	"-	7.5	"-	"-	"-	0.152	2 г 3 мес.	"-	

за препарата составляет 2 капли 3-5 раз в день в один или оба глаза. Такая схема лечения предполагает использование за один день объема (0.25-1) мл препарата.

Одним из этапов фармацевтической разработки глазных капель является изучение влияния фильтрующих материалов на качество препарата. Результаты исследований по изучению химической совместимости раствора препарата и фильтрующих материалов в статических и динамических условиях представлены в Табл. 1.

Данные, приведенные в Табл. 1, показали, что фильтрующие материалы на основе поливинилидендифторида, полиэфирсульфона и полипропилена не повлияли на показатели качества глазных капель азапентацена. Однако при контакте глазных капель азапентацена с мембранами из нейлона типа Posidyne и Ultipor фирмы Pall количественное содержание действующего вещества уменьшилось, т.е. произошла сорбция лекарственного вещества на фильтрующем материале. На процесс сорбции оказывает влияние ряд факторов, среди которых большое значение имеет соотношение площади фильтрации к объему профильтрованного раствора. Поэтому была изучена зависимость степени сорбции от объема профильтрованного раствора.

Фильтрацию 0.015 % раствора азапентацена в количестве 20 л осуществляли с использованием системы для фильтрации раствора, состоящей из фильтров предварительной фильтрации с размером пор 4.5 мкм (материал — полипропилен производства Pall) и с размером пор 2 мкм (материал — нейлон Ultipor производства Pall), фильтра для стерилизующей фильтрации с размером пор 0.2 мкм (материал — нейлон Posidyne производства Pall), насоса центробежного. Качество фильтрата контролировали по следующим показателям: pH раствора, механические включения, количественное содержание лекарственного вещества. Результаты исследования представлены в Табл. 2. Поскольку фильтрующий материал — полипропилен — является нейтральным, на нем сорбция азапентацена происходить не будет. Изменение концентрации связано с фильтрующим материалом на основе нейлона.

Из данных Табл. 2 видно, что сорбция азапентацена (13 %) происходит на фильтрующем материале на основе нейлона. Поэтому для фильтрации раствора азапентацена рекомендованы фильтрующие материалы на основе поливинилидендифторида и полиэфирсульфона.

Проведенные исследования стабильности разработанных глазных капель азапентацен 0.015 % (Табл. 3) в тьюбик-капельницах вместимостью 1 мл, изготовленных из полиэтилена низкой плотности марки PURELL PE 3020 D производства Basell Polyolefins Company N. V., Бельгия, показали, что в процессе хранения при температуре от 8 до 25 °С в защищенном от света месте препарат имеет неизменные показатели качества.

Выводы

1. На основании изучения физико-химических свойств лекарственного вещества азапентацен теоретически обоснован и экспериментально подтвержден рациональный состав глазных капель антикатарактального действия.
2. Результаты изучения влияния pH среды на показатели качества раствора азапентацена позволили определить область pH (7.1-7.8), обеспечивающую стабильность, фармакологическую активность, а также комфортность препарата в применении.
3. В результате изучения совместимости глазных капель азапентацена с различными фильтрующими материалами установлена его сорбция из раствора препарата и факторы, влияющие на данный процесс, что позволило выбрать оптимальные фильтрующие материалы на основе поливинилидендифторида и полиэфирсульфона.
4. Экспериментально доказана физико-химическая, фармако-технологическая и микробиологическая стабильность глазных капель азапентацен 0.015 % при хранении в тьюбик-капельницах вместимостью 1 мл в течение 2 лет при температуре от 8 до 25 °С в защищенном от света месте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Exogenous oestrogen exposure, female reproductive factors and the long-term incidence of cataract: the Blue Mountains Eye Study / G.L. Kanthan, J.J. Wang, G. Burlutsky [et al.] // Acta Ophthalmol. — 2010. — Vol. 88. — P. 773-778.
2. Опыт использования препарата черники для лечения центральной хориоретинальной дегенерации / А.Ж. Фурсова, О.Г. Гусаревич, А.М. Гончар [и др.] // Бюллетень СО РАМН. — 2007. — № 1. — С. 92-96.
3. Battista F. Visual function: the problem with eccentricity / F. Battista, M. Kalloniatis, A. Metha // Clin. Exp. Ophthalmol. — 2005. — Vol. 88. — № 5. — P. 313-321.
4. Егорова Е.В. Ультразвуковая терапия и инстилляцией противокатарактальных препаратов в комплексном лечении больных с возрастной катарактой / Е.В. Егорова // Вестник СамГУ. — Естественнонаучная серия. — 2006. — № 6/2. — С. 233-238.
5. Михеева Е.Г. О применении Квинакса при лечении начальных катаракт / Е.Г. Михеева, Н.А. Шалькова, А.С. Сиимонова // Вест. 1-й обл. клин. больницы (Екатеринбург). —

2002. — Вып. 4, № 3-4. — Режим доступа: http://vestnik.okbl.mplik.ru\3_4_02\033.html.

6. Морозов В.И., Яковлев А.А. Фармакотерапия глазных болезней: Справочник. — М.: Медицина, 2001. — 472 с.

7. Компендиум 2015 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — Режим доступа: <http://pda.compendium.com.ua/info/-8896/kvinaks-sup-sup->.

8. Білоус В.Й. Квінакс в лікуванні катаракт: безпосередні результати застосування / В.Й. Білоус // Тез. доп. наук. конф. офтальмологів, присвяч. 125-річчю з дня народж. акад. В.П. Філатова. — Одеса: Астропринт. — 2000. — С. 46-47.

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

10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 494 с.

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

12. Настанова 42-3.0:2011. — Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Піддружников та ін. — Київ, МОЗ України, 2011. — 42 с.

13. Drug Master File for Azapentacene Polysulfonate Sodium. — Shanghai Medper Co., Ltd., Китай.

14. Сіденко Л.Н. Обоснование основных физических показателей глазных капель антикатарактального действия на основе азапентацен полисульфонат натрия — этап фармацевтической разработки / Л.Н. Сіденко, Л.Н. Андрюкова // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. статей. — Запоріжжя, 2009. — Вип. XXII, Т. 2. — С. 144-147.

УДК: 615.457.1: 617.741-004.1

Резюме

Сіденко Л.М.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»

Фармацевтична розробка очних крапель азапентацен 0.015 %: обґрунтування складу і вибір фільтруючих матеріалів

Показана доцільність створення очних крапель на основі азапентацену, розроблених з урахуванням хімічної теорії формування катаракт. Проведено комплекс експериментальних досліджень з вивчення фізико-хімічних і технологічних властивостей лікарської речовини азапентацен. Встановлено, що порошок азапентацен легко розчинний у воді, чутливий до підвищеної вологості і підвищеної температури. Відносна вологість при зберіганні має становити не більше 22.5 %. У результаті вивчення впливу рН середовища на показники якості 0.015 % розчину азапентацену обґрунтована область рН від 7.1 до 7.8 з точки зору хімічної стабільності і комфортності для ока. Вивчено сумісність різних фільтруючих мембран з розчином очних крапель аза-

пентацену в статичних і в динамічних умовах. Встановлено, що на мембрані з нейлону типу Posidyne і Ultipor фірми Pall відбувається сорбція лікарської речовини. Визначено оптимальні фільтруючі матеріали для процесу фільтрації очних крапель азапентацену: полівінілідендифторид і поліефірсульфон.

Ключові слова: очні краплі, азапентацен, фізико-хімічні властивості, рН, фільтруючі мембрани, катаракта.

UDC 615.457.1: 617.741-004.1

Summary

Sidenko L.M.

State Enterprise «State Scientific Center for Drugs and Medical Products», Kharkiv

Pharmaceutical development of eye drops azapentacene 0.015 %: study the composition and selection of filtering materials

In recent decades have seen a significant increase in the incidence of cataracts, which are among the main causes of blindness in the world. The expediency of creation of eye drops through azapentacene, which are based on the theory of the formation of quinoid cataracts. The complex of experimental studies on physico-chemical and technological properties of the drug substance azapentacene. It is found that the powder azapentacene easily soluble in water, sensitive to high humidity and elevated temperature. Storage relative humidity should be no more than 22.5 %. Solutions azapentacene 0.015 % are more stable when stored in a cool place (4 °C). A study of the effect of pH on quality 0.015 % solution azapentacene substantiated pH range from 7.1 to 7.8 from the viewpoint of the chemical stability and comfort to the drug. Investigated the compatibility of various filtering membranes with a solution of eye drops azapentacene under static and dynamic conditions. It is shown that in terms of pro-transparency, pH, quantitative content azapentacene solution of the drug meets the requirements of regulatory documents. However, upon contact with the eye drops azapentacene membranes such as nylon and Posidyne, Ultipor company «Pall» azapentacene quantitative content decreased, i. e., drug adsorption occurred on the filter material. It is found that the sorption azapentacene (13 %) after filtration membrane of nylon depends on the volume of the filtered solution. The optimal filter materials for filtration process eye drops azapentacene: polyvinylidene and polyether-sulfones. The physicochemical properties of the eye drops, the stability of the drug in a tube-droppers 1 ml capacity made of low density polyethylene grade PURELL PE 3020 D production «Basell Polyolefins Company NV», Belgium and defined conditions and shelf life.

Keywords: eye drops, azapentacene, physico-chemical properties, pH, filtration membranes, cataracts.

Сіденко Лариса Николаевна. Ст. научн. сотр. лаборатории технологии готовых лекарственных средств ГП «ГНЦЛС» (2008), к.фарм.н. (2008).

УДК 615.454

Ляпунов Н.А., Зинченко И.А., Безуглая Е.П.

Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины», Харьков, Украина

Оценка однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в мягких лекарственных средствах

Представлен критический обзор подходов и критериев приемлемости для оценки однородности мягких лекарственных средств в Европейской Фармакопее, в Фармакопее США и в Государственной Фармакопее Украины. Обсуждено понятие однородности относительно гомогенных и гетерогенных систем и предложено определение термина «однородность мягких лекарственных средств». Обоснован подход для оценки однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в мягких лекарственных средствах, основанный на сходимости результатов количественного определения этих веществ в серии отобранных проб. Для характеристики сходимости использован относительный доверительный интервал, который должен быть меньше максимально допустимой неопределенности результатов анализа, служащей критерием приемлемости.

Ключевые слова: мягкие лекарственные средства, однородность, лекарственное вещество, вспомогательное вещество, дисперсные системы.

В общей статье «Semi-solid Preparations for Cutaneous Application» Европейской Фармакопеи [1] и в гармонизированной с ней общей статье «Мягкие лекарственные средства для наружного применения» Государственной Фармакопеи Украины [2] в разделе «Production» («Производство») указано, что «при производстве мягких лекарственных средств для наружного применения, которые содержат одно или более не растворенных в основе действующих веществ (например, эмульсии или суспензии), необходимо принять меры, обеспечивающие однородность получаемого препарата». При этом в общих статьях предусматривается только испытание «Однородность дозированных единиц» для мягких лекарственных средств (МЛС) в контейнерах, содержащих 1 дозу препарата, или в контейнерах с дозирующим устройством. Испытания на однородность нерасфасованного препарата и МЛС в контейнерах без дозаторов, предназначенных для многократного применения, не предусмотрены. Отсутствует определение понятия «однородность МЛС», не указаны виды испытаний, которые необходимо проводить для ее оценки, и какие-либо критерии приемлемости.

В общей статье «Specific Tests for Topically Applied Semisolid Drug Products» («Специальные испытания в отношении мягких лекарственных препаратов для местного применения») Фармакопеи США [3] в разделе «Uniformity in Containers» («Однородность в контейнерах») отмечена важность оценки однородности готовой продукции при выпуске и в течение установленного срока годности. Приведена методика испытания многодозовых препаратов в тубах, предусматривающая визуальную оценку МЛС в отношении разделения фаз, изменения внеш-

него вида, консистенции и других свойств в соответствии с разделом «Описание», а также количественное определение действующего(их) вещества (веществ) в трех пробах, взятых из одной тубы (сверху, со середины и снизу), если масса препарата в тубе более 5 г. При неудовлетворительных результатах дополнительно проводят испытания еще для трех туб. Если масса препарата в тубе менее 5 г, то из двух туб отбирают по 2 пробы (сверху и снизу), а при неудовлетворительных результатах дополнительно проводят испытания еще для двух туб. Дана также методика отбора проб МЛС из других видов контейнеров. Приведены критерии приемлемости А и В относительно однородности содержимого тубы (контейнера). По критериям А результаты трех или четырех количественных определений должны быть в пределах от 90 до 110 % от номинального значения, а относительное стандартное отклонение (RSD) должно быть не более 6 %. Если RSD > 6 %, то применяют критерии В, в соответствии с которыми 12 результатов должны быть в пределах от 90 до 110 % от номинального значения, а RSD для 12 значений должно быть не более 6 %. Допускается также использование критериев, указанных в спецификации на препарат или в фармакопейной монографии.

В указанной общей статье Фармакопеи США [3] не предусмотрены испытания на однородность нерасфасованных препаратов, отсутствует определение понятия «однородность» для мягких лекарственных препаратов и какое-либо обоснование критериев приемлемости. Однородность оценивается по внешнему виду, а также по результатам количественного определения только действующих веществ и их соответствию спецификации, в то время как количественное

содержание таких вспомогательных веществ, как антимикробные консерванты, антиоксиданты и усилители проникновения, не принимается во внимание. Фактически однородность количественного содержания действующих веществ в пробах характеризует только величина RSD, которая в общей статье статистически не обоснована. При максимально допустимом RSD = 6.0 и числе результатов количественного определения от 3 до 12 максимально допустимые значения доверительных интервалов составляют от 17.5 до 10.8 % при допусках для содержания действующего вещества от 90 до 110 % или других допусках, установленных в спецификации или фармакопейной монографии (Табл. 3). Такие критерии приемлемости, наверное, более характеризуют допускаяемую неоднородность распределения лекарственных веществ. Учитывая, что в нерасфасованной продукции и на момент выпуска допуски на содержание действующих веществ в подавляющем большинстве случаев составляют ± 5 % от номинального значения, критерии приемлемости, приведенные в общей статье Фармакопеи США [3], неприемлемы для оценки не только однородности, но и соответствия продукции спецификациям.

Фактически производители должны устанавливать правила отбора проб МЛС из реакторов-гомогенизаторов, а также анализируемые параметры и критерии оценки однородности на свое усмотрение или на усмотрение инспекторов по GMP. В отдельных публикациях указывается порядок отбора проб нерасфасованной продукции из реакторов-гомогенизаторов и туб с препаратом на тубонаполнительной линии при фармацевтической разработке и валидации процессов [4, 5]. Так, отбор проб из реакторов-гомогенизаторов рекомендуется осуществлять из портов отбора проб, если таковые имеются. Места отбора проб должны включать «мертвые зоны», установленные для конкретного реактора. Как правило, приемлем подход с отбором проб из верхней, средней и нижней частей реактора по центральной оси на расстоянии половины радиуса и вблизи боковой поверхности. Если имеется центральный вал, отбирают образцы рядом с валом. Во время процесса наполнения, как правило, отбирают пробы в начале, середине и конце процесса наполнения (всего 10 туб), а также после остановки процесса для моделирования условий «наихудший случай». Если тубонаполнительная машина имеет несколько наполняющих головок, то пробы отбирают от каждой из них. В публикациях указывают, что в ходе валидации процесса может

быть обоснован более сокращенный план отбора проб для рутинного контроля в процессе серийного производства. При этом авторы не обосновывают критерии оценки результатов количественного определения действующих веществ в серии проб и количество проб.

Цель данной публикации — дать приемлемое определение понятию «однородность МЛС», обсудить параметры для оценки однородности и предложить статистически обоснованные критерии приемлемости для оценки однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в МЛС, используя в качестве демонстрационного материала результаты собственных исследований по разработке препаратов и методов их анализа.

Термин «однородность» («*homogeneity*» или «*uniformity*») может иметь различные значения и определения в зависимости от того, к какому объекту, качеству или свойству он относится. Синонимом этого термина является термин «гомогенность». В физической, аналитической и коллоидной химии под *гомогенной системой* понимают систему, состоящую из одной фазы, а под *гетерогенной — систему*, состоящую из двух или более фаз. При этом *фаза* — это часть системы, однородная по составу и строению и отделенная от других фаз границей раздела (межфазной границей). Фаза может быть сплошной или дисперсной. Гомогенная система может быть образована только сплошной фазой. Гетерогенная система может быть образована как сплошными, так и дисперсными фазами. Гетерогенные системы, содержащие дисперсные фазы, называют *дисперсными системами*. При этом сплошная фаза дисперсной системы называется *дисперсионной средой*. В зависимости от агрегатного состояния дисперсионной среды и дисперсной фазы (газообразное, жидкое, твердое) различают такие дисперсные системы, как туманы, дымы и пыли, называемые обобщенно аэрозолями, порошки, пены, эмульсии, суспензии, пасты, твердые пены и дисперсные системы, у которых нет названия, например жидкость, диспергированная в твердом веществе, или твердое вещество, диспергированное в твердом веществе.

На макроуровне однородными могут быть только гомогенные системы, которым может быть свойственна неоднородность по составу и структуре только на микроуровне (на молекулярном и надмолекулярном уровнях, при наличии мицелл), а неоднородность по свойствам в случае их анизотропии.

Гетерогенные системы по определению являются неоднородными. Принятое в химии

понятие «однородность» или «гомогенность» несовместимо с понятием «гетерогенная дисперсная система». Понятие «однородности» («гомогенности») гетерогенных дисперсных систем по составу, структуре и свойствам на макроуровне и микроуровне является относительным и может относиться только к равномерности распределения дисперсной фазы в дисперсионной среде, при котором рассчитываемые статистические показатели будут давать надежную и качественную характеристику анализируемой совокупности. Поэтому для оценки «однородности» гетерогенных систем должны быть четкие статистически обоснованные критерии приемлемости. При этом под процессом «гомогенизации» для гетерогенных дисперсных систем надо понимать не устранение границы раздела фаз, а равномерное распределение дисперсной фазы в дисперсионной среде.

Мягкие лекарственные средства в подавляющем большинстве случаев относятся к гетерогенным дисперсным системам, имеющим жидкую или вязко-пластичную дисперсионную среду. Возможны разные варианты распределения анализируемых лекарственных веществ в системе, например:

- вещество растворено в дисперсионной среде,
- вещество растворено в дисперсной фазе,
- вещество является жидкой дисперсной фазой (эмульсии),
- вещество является твердой дисперсной фазой (суспензии, пасты),
- вещество образует мицеллы или лиотропные жидкие кристаллы,
- вещество солюбилизировано мицеллами или лиотропными жидкими кристаллами — или варианты, представляющие комбинации указанных распределений.

При этом растворение вещества в дисперсионной среде гетерогенных дисперсных систем не является гарантией его равномерного распределения во всем объеме. Так, при большом содержании масляной фазы, кинетической неустойчивости эмульсий и неправильном ведении технологического процесса масляная фаза может скапливаться вверху или внизу реактора или бункера тубонаполнительной машины, уменьшая тем самым в этих участках количество дисперсионной среды с растворенным в ней веществом.

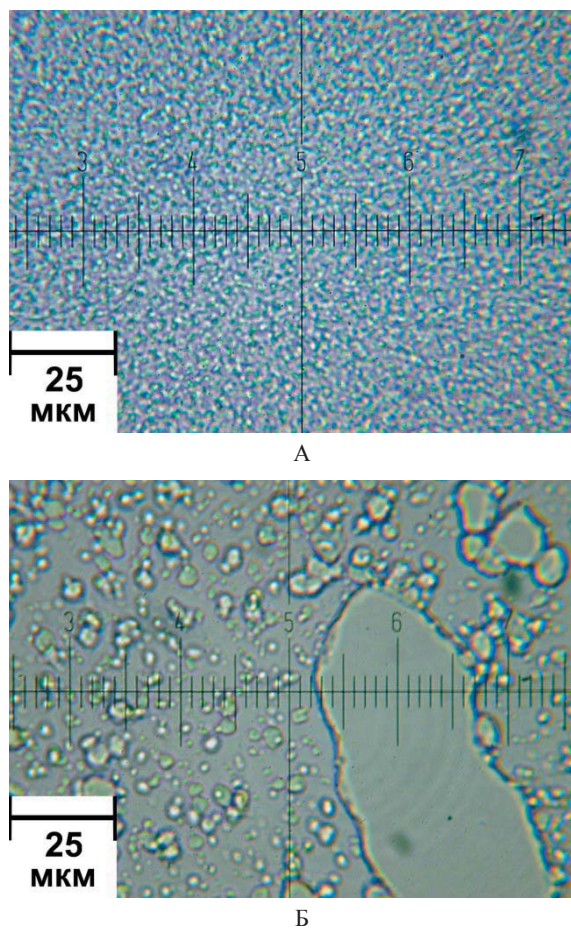
Термин «однородность» в отношении мягких лекарственных средств, видимо, может быть сформулирован следующим образом.

Однородность мягких лекарственных средств – это такая идентичность их количе-

ственного состава, структуры и свойств по всему объему, при которой отличия в количественном составе, структуре и свойствах в разных участках этого объема являются недостоверными или статистически незначимыми.

Идентичность количественного состава характеризуется равномерностью распределения в объеме МЛС действующих и вспомогательных веществ, а при необходимости, сопутствующих примесей. Идентичность структуры может характеризоваться близостью реологических параметров проб, отобранных из разных точек реактора, а также распределением частиц дисперсной фазы на микрофотографиях (Рис. 1). Идентичность свойств можно оценить визуально; нарушение такой идентичности сопровождается расслоением, коагуляцией, наличием механических включений и т.д.

Рисунок 1



Микрофотографии крем-геля до замораживания (А) и после замораживания, размораживания и нагревания до температуры 25 °С (Б), демонстрирующие возникшую неоднородность распределения масляной фазы

В идеальном случае однородность можно было бы оценивать относительно всех показателей, включенных в спецификацию, а также

важных свойств, которые в нее не включены, например, кинетики высвобождения лекарственных веществ в опытах *in vitro*. Однако оценивать однородность следует в разумных рамках, основываясь на определении критических показателей качества, значимых для эффективности и безопасности всего объема продукции, а также для гарантии ее соответствия спецификациям. В соответствии с Руководством ICH Q8 [6, 7], **критический показатель качества** — это физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которая для обеспечения необходимого качества продукции должна находиться в соответствующих пределах, соответствующем диапазоне или иметь соответствующее распределение. Следует признать, что однородность распределения лекарственных и вспомогательных веществ является одним из самых критических показателей качества МЛС, который не включают в спецификации.

Необходимо дифференцировать соответствие показателя качества препарата критериям приемлемости, указанным в спецификации, и его соответствие критериям приемлемости для оценки однородности, в частности, равномерного распределения лекарственных и вспомогательных веществ. В самом деле, распределение может быть однородным, а количественное содержание вещества может находиться за пределами, установленными в спецификации, и наоборот. Поэтому необходимо логичное сочетание критериев спецификации с критериями однородности.

Так, например, в общей статье Фармакопеи США [3] однородным считается препарат, если, с одной стороны, количественное содержание действующего вещества входит в пределы от 90 до 110 % от номинального значения, хотя очевидно, что однородность следует оценивать по отклонению от среднего значения. С другой стороны, критерий однородности является $RSD \leq 6.0$, при котором в пределы от 90 до 110 % может попасть среднее значение, но далеко не все результаты количественного определения. Очевидно, что для оценки однородности необходим другой подход.

Оценивать равномерность распределения вещества в препарате рационально по *сходимости* результатов его количественного определения в серии проб. При валидации аналитических методик для оценки *сходимости* (*прецизионности*) используют относительный доверительный интервал (Δ_z), который должен быть меньше максимально допустимой неопределенности результатов анализа (Δ_{As}), определяемой по уравнению [8, 9]:

$$\Delta_{As} = B \times 0.32,$$

где:

B — допуски, установленные для содержания анализируемого вещества в спецификации.

При $B = 5.0\%$ $\Delta_z \leq 1.6\%$, а при $B = 10.0\%$ $\Delta_z \leq 3.2\%$.

Полная неопределенность методики анализа (Δ_{As}) включает в себя неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) [8, 9]:

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

Неопределенность аналитической методики и вариабельность результатов анализа являются «шумом», не позволяющим получить совершенно одинаковые результаты анализа для идеально однородного объекта, например истинного раствора лекарственного вещества. Если при статистической обработке результатов количественного определения вещества в серии проб доверительный интервал оказывается меньше или равен максимально допустимой неопределенности результатов анализа, соответствующей установленным в спецификации пределам, то распределение вещества в МЛС можно считать однородным. Дополнительным условием должно быть соответствие количественного содержания вещества в каждой пробе требованиям спецификации. Все результаты должны входить в установленные пределы, потому что любая часть, взятая из объема МЛС, должна быть качественной.

В соответствии с этим подходом для оценки однородности МЛС по результатам количественного определения можно использовать только аналитические методики, которые прошли валидацию и соответствуют критериям приемлемости [8, 9]. При этом сравнение *сходимости* результатов количественного определения анализируемого вещества в пробах МЛС со *сходимостью* результатов анализов модельных растворов, полученных в ходе валидации аналитической методики, а также ее полной суммарной неопределенностью может дать дополнительную информацию об однородности распределения этого вещества в МЛС.

Приводим пример оценки однородности с использованием описанного подхода. Объектом исследования стал препарат в форме кремгеля, содержащий 10 % метилсалицилата, который находится в гидрофильной гелевой основе в виде дисперсной фазы⁽¹⁾. В спецификации

¹ В данной статье представлен пример, демонстрирующий оценку однородности распределения в объеме МЛС лекарственного вещества, являющегося дисперсной фазой эмульсии. В следующих публикациях будут приведены примеры оценки однородности распределения суспендированных лекарственных веществ, а также вспомогательных веществ (консервантов, антиоксидантов и др.).

Таблица 1

Результаты количественного определения метилсалицилата (МС) в 9 пробах крем-геля и их статистическая обработка

№ пробы	Содержание МС в пробе, мг/г	Содержание МС в пробе, % (нормализованные значения)
1	101.14	101.14
2	101.39	101.39
3	100.57	100.57
4	100.96	100.96
5	101.36	101.36
6	101.57	101.57
7	100.92	100.92
8	100.78	100.78
9	100.27	100.27
Среднее	101.00	101.00
Относительное стандартное отклонение, $RSD_{z1} \% =$		0.4142
Относительный доверительный интервал $\Delta_z \% = t(95\%, 9 - 1) \times RSD_z = 1.8595 \times 0.4142 =$		0.7702
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta_{As1} \% =$		1.6
Оценка сходимости		0.7702 < 1.6
Вывод о распределении		Однородное

было установлено содержание $C_8H_8O_3$ (метилсалицилата) в пределах от 95.0 до 105.0 мг в 1 г нерасфасованного геля и в 1 г готового препарата (100.0 мг \pm 5.0 %). Препарат изготовили в вакуумном реакторе-гомогенизаторе фирмы «Промвит» (Украина), моделирующем промышленное оборудование [10, 11]. После изготовления препарата было отобрано 9 проб крем-геля «по спирали» из разных точек реактора-гомогенизатора. Число проб соответствовало числу модельных растворов при валидации аналитической методики количественного определения метилсалицилата.

Анализ выполняли по разработанной нами методике количественного определения метилсалицилата методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE с использованием стальной колонки размером 150 мм \times 2.1 мм Discovery® HS C 18 с диаметром частиц 3 мкм.

В Табл. 1 приведены результаты количественного определения метилсалицилата в 9 пробах крем-геля, результаты расчетов метрологических характеристик и их сравнение с критерием приемлемости $\Delta_{As} = 1.6 \%.$

Как следует из данных, представленных в Табл. 1, относительный доверительный интервал, характеризующий сходимость результатов количественного определения метилсалицилата в 9 пробах, примерно в 2 раза меньше максимально допустимой полной неопределенности

методики анализа $\Delta_z \leq 1.6 \% (B = 5.0 \%).$ То есть, отклонения в количественном содержании метилсалицилата от среднего значения в каждой из 9 проб находятся в рамках неопределенности методики его количественного определения, являются статистически незначимыми, а распределение метилсалицилата в препарате следует считать однородным.

В Табл. 2 приведены результаты количественного определения метилсалицилата в 9 модельных растворах, полученные при валидации аналитической методики, и результаты расчетов метрологических характеристик.

Из данных Табл. 2 следует, что методика количественного определения метилсалицилата характеризуется достаточной правильностью, так как выполняются критерии статистической и практической незначимости систематической ошибки методики. Методика характеризуется достаточной сходимостью, так как найденное значение относительного доверительного интервала величины Z (0.8035 %) меньше критического значения для сходимости результатов (1.6 %) (Табл. 2). Полная неопределенность методики (Δ_{As}), включающая неопределенность пробоподготовки (Δ_{Sp}) и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}), по результатам расчетов и аналитических исследований составила 0.89 %.

При сопоставлении относительного доверительного интервала, характеризующего сходимость результатов количественного определения метилсалицилата в 9 пробах ($\Delta_z = 0.7702 \%$), и результатов валидации аналитической мето-

дики очевидно, что различия в результатах количественного определения метилсалицилата в 9 пробах крем-геля связаны исключительно с неопределенностью методики анализа, а распределение метилсалицилата в препарате является однородным.

Об однородности распределения дисперсной фазы в крем-геле свидетельствует также его микрофотография (Рис. 2).

В Табл. 3 приведены расчеты, демонстрирующие предельные (максимально допустимые) значения относительного стандартного отклонения (RSD_{max}) при максимально допустимых значениях относительных доверительных интервалов $\Delta_{max} = 1.6\%$ и $\Delta_{max} = 3.2\%$, а также максимально допустимые величины Δ_{max} при $RSD_{max} = 6.0$ и разном числе анализируемых проб.

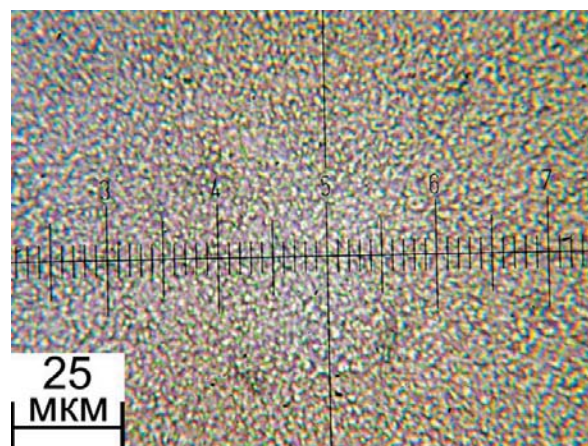
С увеличением числа проб с 3 до 12 при постоянных максимально допустимых значениях относительного доверительного интервала максимально допустимые значения RSD увеличиваются, однако при $\Delta_{max} = 1.6\%$ RSD_{max} не превышает 0.9, а при $\Delta_{max} = 3.2\%$ RSD_{max} не превышает 1.8 (Табл. 3).

Предложенный нами подход для оценки однородности распределения веществ в нерасфасованных МЛС, основанный на *сходимости* результатов количественного определения в раз-

ных пробах, может быть распространен также и на МЛС, расфасованные в тубы и другие виды первичной упаковки.

Подход для оценки однородности мягких лекарственных препаратов в тубах и других видах контейнеров, установленный в общей статье «Specific Tests for Topically Applied Semisolid Drug Products» Фармакопеи США [3] следует признать некорректным. Этот подход регла-

Рисунок 2



Микрофотография крем-геля, содержащего 10 % метилсалицилата, которая демонстрирует однородность распределения дисперсной фазы

Таблица 2

Результаты анализа модельных смесей, содержащих метилсалицилат в диапазоне применения методики, и их статистическая обработка

№ раствора	Введено в % от номинальной концентрации (X_i , факт., %)	Найдено в % от номинальной концентрации (Y_i , %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$
1	80.36	80.35	99.99
2	85.38	84.88	99.41
3	90.40	89.46	98.96
4	95.42	95.49	100.07
5	100.44	100.25	99.81
6	105.46	104.86	99.43
7	110.50	110.71	100.19
8	115.52	115.46	99.95
9	120.54	120.82	100.23
Среднее, Z_{cp} , % =			99,78
Относительное стандартное отклонение, RSD_z , % =			0.4321
Относительный доверительный интервал Δ_z , % = $t(95\%, 9 - 1) \times RSD_z = 1.8595 \times 0.4321 =$			0.8035
Критическое значение для сходимости результатов Δ_{Asi} , % =			1.6
Оценка сходимости			$0.8035 < 1.6$
Систематическая ошибка δ , % = $ Z_{cp} - 100 =$			0.22
Критерий незначимости систематической ошибки:			
1) статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z / \sqrt{9} = 0.8035\% / 3 = 0.27\% > 0.22\%$			Выполняется
Если не выполняется 1), то $\delta \leq \max \delta$:			
2) практическая незначимость: $\delta \leq 0.32 \times 1.6\% = 0.51\% > 0.22\%$			Выполняется
Общий вывод о методике			Корректна

ментрирует в качестве критерия приемлемости RSD_{max} на уровне не более 6 % для пределов содержания действующих веществ от 90 до 110 % от номинального значения или для других пределов, установленных в спецификациях или фармакопейных монографиях, независимо от числа проб от 3 до 12 [3]. С уменьшением числа проб при постоянном $RSD_{max} = 6.0$ максимально допустимые значения относительного доверительного интервала увеличиваются и находятся в пределах от 10.8 до 17.5 %, что неприемлемо для оценки однородности распределения действующих веществ при допусках их содержания в МЛС ± 10 % и тем более ± 5 % от номинального значения.

Разработанный подход для оценки однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в объеме нерасфасованной продукции, который основан на сходимости результатов количественного определения анализируемого вещества в 9 пробах, отбираемых «по спирали» из разных точек реактор-гомогенизатора, был использован нами при фармацевтической разработке и трансфере технологий различных мазей, кремов, крем-гелей и гелей, представляющих собой как гомогенные, так и гетерогенные дисперсные системы, в частности эмульсии и суспензии. Этот подход себя полностью оправдывает на практике, поскольку позволяет подтвердить корректность разработки технологического процесса и переноса технологии, а также соответствие качества всей массы изготовленного препарата требованиям спецификации. Используя данный подход, научные сотрудники или технологи могут разрабатывать конкретные методики для оценки однородности МЛС. При этом число проб и точки их отбора могут отличаться в зависимости от особенностей конструкции

реакторов-гомогенизаторов и объемов серий, а также этапов жизненного цикла продукции (фармацевтическая разработка, трансфер технологии, сопровождающийся валидацией процесса, или серийное производство), на которых используется методика.

Выводы

1. Представлен критический обзор подходов и критериев приемлемости для оценки однородности мягких лекарственных средств в Европейской Фармакопее, Фармакопее США и Государственной Фармакопее Украины.

2. Обсуждено понятие однородности относительно гомогенных и гетерогенных систем и предложено определение термина «однородность мягких лекарственных средств».

3. Обоснован подход для оценки однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в мягких лекарственных средствах, основанный на *сходимости* результатов количественного определения этих веществ в серии отобранных проб. Для характеристики сходимости использован относительный доверительный интервал, который должен быть меньше максимально допустимой неопределенности результатов анализа, служащей критерием приемлемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Semi-solid Preparations for Cutaneous Application // European Pharmacopoeia 8.0. — P. 807-809.
 2. М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування // Державна Фармакопея України. — 1-е вид. — Доповнення 3. — С. 126-130.
 3. Topical and Transdermal Drug Products. Specific Tests for Topically Applied Semisolid Drug Products // USP 36. — P. 39-40.
 4. Validation of pharmaceutical processes / Ed. by James P. Agalloco, Frederick J. Carleton. — 3rd ed. — Informa Healthcare USA, Inc. — 2008. — 762 p.

Таблица 3

Числовые значения RSD_{max} при $\Delta_{max} = 1.6$ % и $\Delta_{max} = 3.2$ %, а также Δ_{max} при $RSD_{max} = 6$ и разном числе анализируемых проб

Число проб (n)	Число степеней свободы	Коэффициент Стьюдента t (95 % или 90 %, n - 1)	RSD_{max} при $\Delta_{max} = 1.6$ %	RSD_{max} при $\Delta_{max} = 3.2$ %	Δ_{max} при $RSD_{max} = 6$
3	2	2.9200	0.55	1.10	17.5
4	3	2.3534	0.68	1.36	14.1
5	4	2.1318	0.75	1.50	12.8
6	5	2.0150	0.79	1.59	12.1
7	6	1.9432	0.82	1.65	11.7
8	7	1.8946	0.84	1.69	11.4
9	8	1.8595	0.86	1.72	11.2
10	9	1.8331	0.87	1.75	11.0
11	10	1.8125	0.88	1.77	10.9
12	11	1.7956	0.89	1.78	10.8

5. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products / Rong-Kun Chang, Andre Raw, Robert Lionberger and Lawrence Yu. — The AAPS Journal. — Vol. 15, № 1, January 2013. — P. 41-52.
6. EMEA/CHMP/167068/2004 — ICH. — Part I. — ICH Topic Q 8 (R2). — Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development, 2009.
7. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. — Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Підпружников та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. — К.: МОЗ України, вид-во «МОРІОН», 2012. — С. 21-56.
8. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — С. 58-67.
9. 2.2.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України. — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — С. 85-100.
10. Мягкие лекарственные средства: фармацевтическая разработка и трансфер технологии / Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Зинченко И.А. и др. // Фармацевтическая отрасль. — 2014. — № 5 (46) октябрь. — С. 22-33.
11. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов. Глава 9 / Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Столпер Ю.М. и др. // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств (в 3 томах) / Под ред. В.П. Георгиевского. — Том 3. Метрологическое и нормативное обеспечение создания, производства и контроля качества лекарственных средств. — Харьков: НТМТ, 2011. — Т. 3. — С. 1419-1512.

УДК 615.454

Резюме

Ляпунов М.О., Зинченко І.О., Безугла О.П.

Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс “Інститут монокристалів” НАН України», Харків, Україна

Оцінювання однорідності розподілу лікарських та допоміжних речовин в м'яких лікарських засобах

Наведено критичний огляд підходів та критеріїв прийнятності для оцінки однорідності м'яких лікарських засобів в Європейській Фармакопеї, в Фармакопеї США та в Державній Фармакопеї України. Обговорено поняття однорідності стосовно гомогенних і гетерогенних систем та запропоновано визначення терміна «однорідність м'яких лікарських засобів». Обґрунтовано підхід для оцінки однорідності розподілу лікарських і допоміжних речовин в м'яких лікарських засобах, заснований на збіжності результатів кількісного визначення цих речовин в серії відібраних проб. Для характеристики збіжності використано відносний довірчий інтервал, що має бути меншим за максимально допустиму невизначеність результатів аналізу, яка служить критерієм прийнятності.

Ключові слова: м'які лікарські засоби, однорідність, лікарська речовина, допоміжна речовина, дисперсні системи.

UDC 615.454

Summary

Lyapunov M.O., Zinchenko I.O., Bezuglaya O.P.

State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Evaluation of uniformity of active substance and excipients distribution in semi-solid preparations

The article contains a critical review of the approaches and acceptance criteria for the evaluation of uniformity of semi-

solid preparations in accordance to the European Pharmacopoeia, USP and the State Pharmacopoeia of Ukraine. According to the requirements of the European Pharmacopoeia and the State Pharmacopoeia of Ukraine in the manufacture of semi-solid preparations for cutaneous application measures should be taken to ensure appropriate homogeneity of the preparation to be delivered. These pharmacopoeia contain only a test «Uniformity of dosage units», but the tests for assessment of uniformity of bulk product and semi-solids in containers without dispensers for repeated use, are not provided. The definition of term «uniformity of semi-solid preparations», tests to be carried out to evaluate it as well as any acceptance criteria are not available. The USP describes a method of testing multi-dose preparations in the tube, but the acceptance criteria for assessment uniformity are not statistically justified. The concept of uniformity with respect to homogeneous and heterogeneous systems was discussed and it was stressed that the concept of «uniformity» for heterogeneous disperse systems is relative and can be applicable only to the uniform distribution of the dispersed phase in the dispersion medium. The definition of «uniformity of semi-solid preparations» was proposed. The approach to assess uniformity of distribution of medicinal substances and excipients in semi-solid preparations, based on the repeatability of the results of the assay of these substances in a set of samples was justified. The relative confidence interval was used to characterize the repeatability. It should be less than the maximum uncertainty of the analysis, which serves as the acceptance criterion. It was shown that only validated analytical procedures should be used for evaluating uniformity. An example to demonstrate the assessment of uniform distribution of methyl salicylate, which is the dispersed phase of the emulsion, is provided. It is shown that the distribution of methyl salicylate in the preparation is homogeneous and the differences in the results of the assays for 9 samples are associated only with uncertainty of analytical procedure. The proposed approach can be used to develop methodologies for evaluation of the homogeneity of the semi-solid preparations at different stages of the product life cycle.

Keywords: semi-solid preparations, uniformity, active substance, excipient, disperse systems.

Ляпунов Николай Александрович (р. 1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1972). Ведущий научный сотрудник Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины» (2013). Д.фарм.н. (1990). Профессор (1993).

Зинченко Игорь Александрович (р. 1990). Окончил Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, химический факультет (2013). Инженер отдела № 8 Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс “Институт монокристаллов” НАН Украины» (2013).

Безуглая Елена Петровна. Ст. науч. сотр. отдела № 8 Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс “Институт монокристаллов” НАН Украины» (2013). К.фарм.н. (1996). Ст. науч. сотр. (2000).

УДК 547.781+544.016.4

Ляпунов А.Н.

Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины», Харьков, Украина

Исследование растворимости мелоксикама и мелоксикама трометамола в некоторых неводных и смешанных растворителях

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения мелоксикама в растворах. По данной методике исследована растворимость мелоксикама в некоторых неводных и смешанных растворителях при температуре 25 °С, а также мелоксикама трометамола в смешанных растворителях *вода – N-метилпирролидон (N-МП)* и *вода – N-МП – этанол (96 %)* в зависимости от их состава, концентрации трометамола и рН растворов. С увеличением концентрации трометамола повышается содержание мелоксикама в насыщенных растворах и их рН. Для получения растворов с достаточно высокой концентрацией мелоксикама трометамола в широком диапазоне рН рационально использовать смешанный растворитель: *N-МП (15 %), этанол (25 %) и вода (60 %)*. Для образования в растворах мелоксикама трометамола содержание трометамола должно превышать его эквивалентное количество примерно на 4,5 %, что приводит к повышению рН этих растворов.

Ключевые слова: мелоксикам, растворимость, растворитель, рН, аналитическая методика.

На этапе фармацевтической разработки должны быть исследованы физико-химические свойства лекарственного вещества, которые могут влиять на функциональные характеристики лекарственного препарата [1]. Таким физико-химическим свойством является растворимость лекарственного вещества, которая во многом определяет его высвобождение из лекарственной формы, проницаемость, биодоступность и эффективность действия [2].

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) должны находиться в гелях для кожного применения в виде раствора, чтобы произошло их высвобождение, трансдермальная абсорбция и проявление специфического противовоспалительного и обезболивающего действия [3]. Одним из перспективных НПВС является мелоксикам – селективный ингибитор ЦОГ-2 [4]. Способность мелоксикама в терапевтических дозах ингибировать преимущественно синтез провоспалительных простагландинов в очаге воспаления при сохранении биосинтеза цитопротективных простагландинов в желудочно-кишечном тракте и почках обуславливает его высокую эффективность и хорошую переносимость [5]. До 2014 года мировая номенклатура препаратов мелоксикама включала растворы для инъекций, таблетки и ректальные суппозитории, тогда как лекарственные формы для кожного применения, которые бы содержали мелоксикам в виде раствора и обеспечивали трансдермальное поступление мелоксикама к очагу поражения, в отличие от большинства НПВС, отсутствовали [4, 6, 7]. Поэтому актуальными являлись исследования по созданию геля мелоксикама для наружного применения, в котором мелоксикам находился бы в виде раствора.

Цель данной работы – исследование растворимости мелоксикама и мелоксикама трометамола в неводных и смешанных растворителях в рамках фармацевтической разработки геля мелоксикама.

Объекты и методы

В качестве объектов исследований использовали мелоксикам (ULKAR KIMYA Sanayii Ve Ticaret A.S.) [4, 8], 5-метил-2-аминотиазол (Fluka, Cat. № 08562), трометамол (Merck, Cat. № 108386), *N*-метилпирролидон (*N*-МП) (Ashland Speciality Ingredients), этанол (96 %), изопропанол, пропиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), воду очищенную [8, 9], смешанные растворители, растворы мелоксикама и мелоксикама трометамола.

Величину рН измеряли потенциометрически (2.2.3) [8] непосредственно в растворах с помощью рН-метра Metrohm 827 lab (Metrohm), снабженного электродом типа Porotrode (Metrohm, кат. № 6.0235.100).

Растворимость мелоксикама исследовали изотермическим методом, а концентрацию насыщенного раствора определяли методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях (2.2.25) [8] по разработанной нами методике. С этой целью избыточное количество мелоксикама помещали в сосуды с притертыми пробками, заливали растворителем соответствующего состава и термостатировали при температуре (25 ± 0.1) °С при периодическом перемешивании до наступления термодинамического равновесия. Контроль за установлением этого равновесия в системе осуществляли путем отбора проб надосадочной жидкости (раствора) и измерения их оптической плотности. Постоянство значений оптической плотности серии последова-

тельно отобранных проб свидетельствовало о наступлении термодинамического равновесия в исследуемой системе. Затем растворы выдерживали 3-4 ч в состоянии покоя при температуре $(25 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$, отфильтровывали от осадка при этой же температуре и отбирали пробы для анализа.

При исследовании растворимости мелоксикама в смешанных растворителях, состоящих из воды и неводного растворителя, избыточное количество мелоксикама растворяли в точно отweighенном количестве неводного растворителя, а затем добавляли необходимое количество воды для получения растворителя заданной концентрации. Далее поступали, как описано выше, начиная со слов «термостатировали при температуре $(25 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании до наступления термодинамического равновесия...».

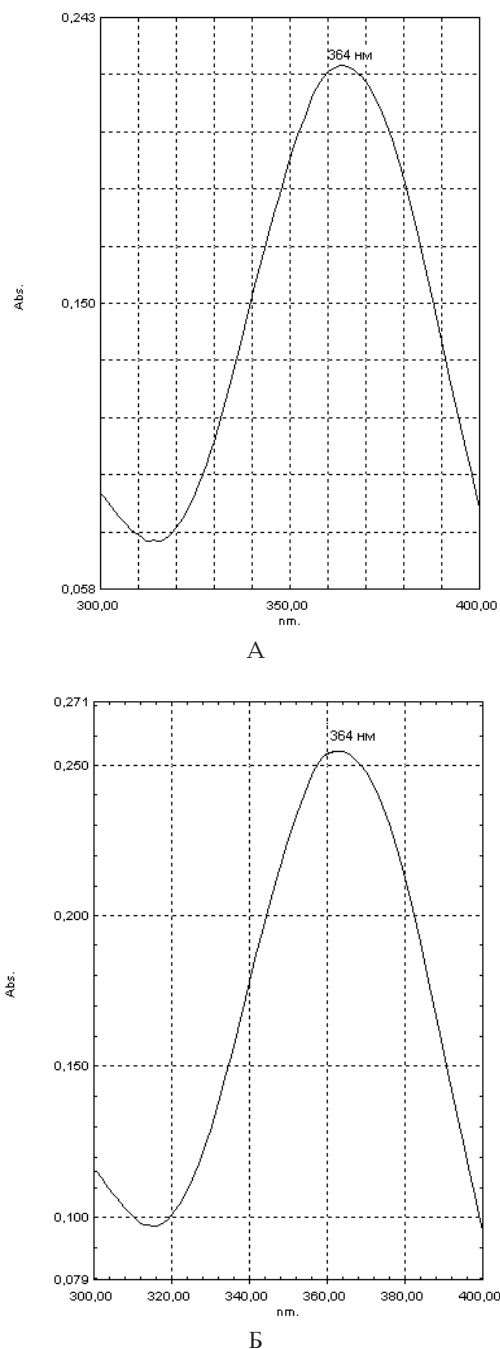
Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Shimadzu PharmaSpec UV-1700 с программным обеспечением UVProbe версии 2.21; оптическую плотность измеряли на максимуме поглощения при длине волны 364 нм. Для этого прозрачный насыщенный раствор мелоксикама разбавляли метанолом так, чтобы значения оптической плотности полученных растворов находились в пределах от 0.1 до 1.6. Для спектрофотометрической методики количественного определения мелоксикама в растворах были определены такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, прецизионность (сходимость), линейность и диапазон применения [10].

Длина волны максимума оптического поглощения раствора мелоксикама равна 364 нм (Рис. 1А) и совпадает с длиной волны максимума оптического поглощения (364 нм) испытуемого раствора мелоксикама трометамола (Рис. 1Б). В рамках аналитической методики неводные растворители (этанол, изопропанол, ДМСО, *N*-МП, пропиленгликоль) не влияют на длину волны максимума оптического поглощения мелоксикама. Оптическая плотность метанола при длине волны 364 нм и разведенных метанолом растворов плацебо, содержащих указанные выше неводные растворители, не превышает 0.001, что меньше погрешности прибора и статистически незначимо. При длине волны 364 нм статистически незначимо также оптическое поглощение 5-метил-2-аминотиазола (продукта разложения мелоксикама) даже при одинаковых концентрациях в растворе этой примеси и мелоксикама (Рис. 2). Полученные данные подтверждают специфичность методики.

Правильность, прецизионность (сходимость) и линейность методики исследовали в диапазоне концентраций мелоксикама в растворах от 2.14 до 31.98 мкг/мл. Раствор сравнения содержал 4.6304 мкг/мл мелоксикама. Результаты исследований представлены в Табл. 1 и на Рис. 3.

Методика количественного определения мелоксикама характеризуется достаточной сходимостью (прецизионностью) в указан-

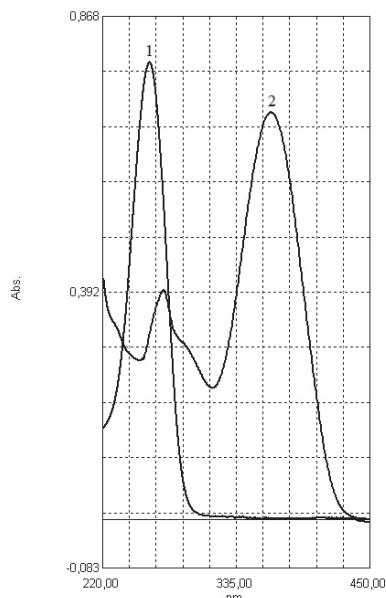
Рисунок 1



Спектры поглощения раствора мелоксикама (А) и раствора соли мелоксикама и трометамола (Б)

ном диапазоне концентраций, так как найденное значение относительного доверительного интервала величины \bar{Z} составляет всего лишь 1.1547 % (Табл. 1). Это, например, меньше критического значения 1.6 % для сходимости результатов при допусках ± 5 %. Методика также характеризуется достаточной правильностью, так как величина систематической погрешности ($\Delta = 0.29$ %) удовлетворяет требованиям критерия статистической незначимости:

Рисунок 2



Спектры поглощения растворов 5-метил-2-аминотриазола (1) и мелоксикама (2)

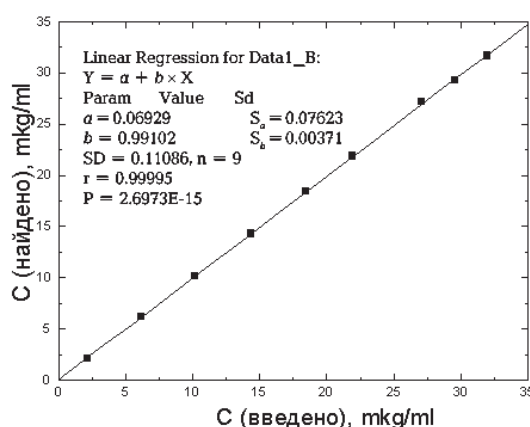
$1.1547\% / \sqrt{9} = 0.39\% > 0.29\%$ (Табл. 1) и статистически неотличима от нуля.

Линейность зависимости между взятой и найденной концентрацией мелоксикама в диапазоне от 2.14 до 31.98 мкг/мл подтверждает высокое значение коэффициента корреляции $r = 0.99995$, а также тот факт, что в регрессионном уравнении ($Y_i = a + b \times X_i$) свободный член (a) не превышает свой доверительный интервал и статистически неотличим от нуля:

$$a = 0.06929 \leq t(95\%, n - 2) \times S_a = |1.895 \times S_a| = |1.895 \times 0.07623| = 0.1445.$$

Результаты валидационных исследований спектрофотометрической методики количе-

Рисунок 3



Линейная зависимость найденной концентрации мелоксикама от его введенной концентрации

Таблица 1

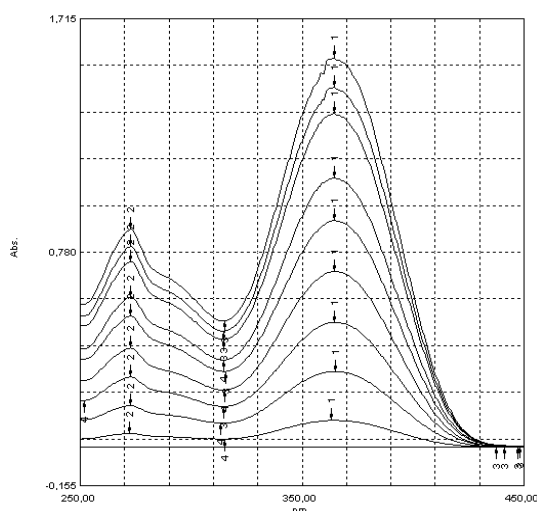
Результаты анализа модельных растворов, содержащих от 2.14 до 31.98 мкг/мл мелоксикама, и их статистическая обработка

№ раствора	Введено, С, мкг/мл (X_i)	Найдено, С, мкг/мл (Y_i)	Найдено в % к введенному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$
1	2.14	2.16	100.93
2	6.15	6.14	99.84
3	10.17	10.15	99.80
4	14.38	14.29	99.37
5	18.47	18.42	99.73
6	21.94	21.88	99.73
7	27.11	27.15	100.15
8	29.60	29.26	98.85
9	31.98	31.66	99.00
Среднее, Z_{cp} , % =			99.71
Относительное стандартное отклонение, RSD_z , %			0.6210
Относительный доверительный интервал, Δ_z , % $\Delta\% = t(95\%, n - 1)RSD_z = 1.8595 \times RSD_z$			1.1547
Систематическая погрешность, $\delta = Z_{cp} - 100 $, %			0.29
Критерий незначимости систематической погрешности: статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z / \sqrt{9} = 1.1547 / 3 = 0.39\% > 0.29\%$			Выполняется
Общий вывод о методике			Корректна

ственного определения мелоксикама позволяют считать ее корректной в диапазоне концентраций от 2.14 до 31.98 мкг/мл по таким характеристикам: специфичность, сходимость (прецизионность), правильность и линейность. Данную методику можно использовать для количественного определения мелоксикама в растворах.

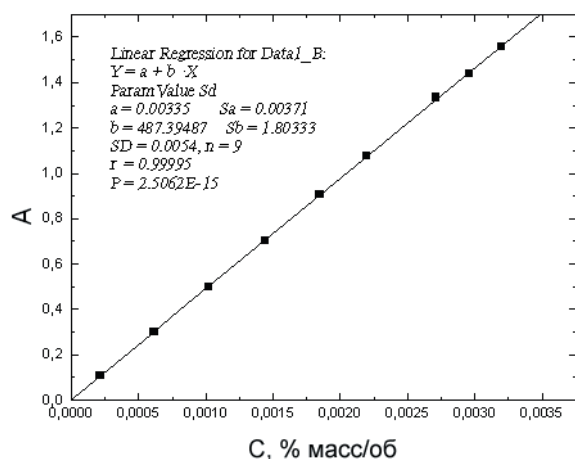
На Рис. 4 представлены спектры растворов мелоксикама в метаноле при разных концентрациях мелоксикама, а на Рис. 5 — зависимость оптической плотности этих растворов от концентрации мелоксикама при $\lambda_{\max 1} = 364$ нм.

Рисунок 4



Спектры растворов мелоксикама в метаноле при разных концентрациях мелоксикама ($\lambda_{\max 1} = 364$ нм) (концентрации см. в Табл. 1)

Рисунок 5



Зависимость оптической плотности (A) растворов мелоксикама в метаноле от концентрации мелоксикама (% м/об)

Как следует из Рис. 5, в области концентраций от 0.000214 до 0.003198 % (м/об) (от 2.14 до 31.98 мкг/мл) зависимость оптической плот-

ности от содержания мелоксикама является линейной. Линейность этой зависимости подтверждает высокое значение коэффициента корреляции $r = 0.99995$, а также тот факт, что в регрессионном уравнении ($Y_i = a + b \times X_i$) свободный член (a) не превышает свой доверительный интервал и статистически неотличим от нуля:

$$a = 0.00335 \leq t(95\%, n-2) \times S_a = \\ = |1.895 \times S_a| = |1.895 \times 0.00371| = 0.00703.$$

Как следует из спектров на Рис. 1, максимум поглощения мелоксикама соответствует длине волны 364 нм. Удельный показатель поглощения при длине волны 364 нм равен 490.26 ± 0.35 . Концентрацию мелоксикама в растворе рассчитывали по формуле:

$$C = A \times \gamma / A_{1\text{см}}^{1\%} \times b,$$

где:

- C — концентрация мелоксикама, г/100 мл;
- A — оптическая плотность испытуемого раствора;
- $A_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения мелоксикама;
- b — толщина поглощающего слоя, в сантиметрах;
- γ — разведение.

Концентрация мелоксикама в насыщенных растворах, содержащих разные растворители, при температуре 25 °С представлена в Табл. 2.

Как следует из Табл. 2, мелоксикам очень мало растворим в изопропанол и этаноле (96 %), мало растворим в пропиленгликоле, растворим в ДМСО и N-МП. Поскольку N-МП обладает лучшей растворяющей способностью, была исследована растворимость мелоксикама в смешанных растворителях N-МП — вода в зависимости от их состава при температуре 25 °С. Результаты исследований представлены в Табл. 3.

Как следует из Табл. 3, мелоксикам практически нерастворим в воде. С увеличением концентрации N-МП растворимость мелоксикама в смешанных растворителях N-МП — вода увеличивается. Однако растворимость мелоксикама, которая может быть значима для создания препарата в форме геля, имеет место только при концентрациях N-МП 80-100 %. При этом доминирует структура смешанного растворителя с преобладанием структуры N-МП (~75 до ~95 % (м) N-МП) или структура неводного растворителя (C N-МП ≥ 95 % (м)) [11]. Применение N-МП в геле в столь высоких концентрациях может привести к побочным эффектам.

В препарате «Мовалис», раствор для внутримышечного введения 1.5 мг/1.5 мл [4, 6, 7]

мелоксикам находится в виде растворимой в воде соли с органическим основанием меглумином, который является вторичным амином и содержит в молекуле 5 гидроксильных групп [8]. Этот состав подпадает под патент США фирмы Boeringer Ingelheim Corporation [12], в котором показано образование соли между мелоксикамом и органическим амином. Учитывая включение в состав геля гидрофильных растворителей, в качестве органического основания был использован первичный амин трометамол [8, 9], который содержит в молекуле только 3 гидроксильные группы. Трометамол одновременно может выступать в качестве нейтрализатора карбомеров при содержании в гелях значительных количеств гидрофильных растворителей (в частности, этанола) в концентрациях до 60 % [9].

Мелоксикам образует в растворах с трометамолом соль (Рис. 6).

Была исследована растворимость мелоксикама в смешанных растворителях *вода – N-МП* и *вода – этанол – N-МП* при различных соотношениях растворителей в зависимости от концентрации трометамола и рН. Мелоксикам растворяли в *N-МП*, а трометамол – в воде; водный раствор при необходимости смешивали с

этанолом (96 %), а затем с раствором мелоксикама. Смесь выдерживали 24 ч при температуре 25 °С и отфильтровывали осадок. Определяли рН фильтрата и содержание в нем мелоксикама. Репрезентативные результаты исследований представлены в Табл. 4, а также на Рис. 7-9.

Как следует из Табл. 4, введение трометамола и увеличение его концентрации приводит к увеличению рН растворов. Добавление ~0.10-0.35 % трометамола приводит вначале к резкому повышению рН растворов, после чего с увеличением концентрации трометамола рН растворов возрастает менее интенсивно (Табл. 4, Рис. 7). Чем выше содержание *N-МП*, тем ниже рН растворов при данной концентрации трометамола (Рис. 7). Самые низкие значения рН растворов наблюдали при использовании растворителя, содержащего 15 % *N-МП*, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды (Рис. 7).

Как следует из Табл. 4 и Рис. 8, введение трометамола и увеличение его концентрации приводит к увеличению содержания мелоксикама в насыщенных растворах. В диапазоне концентраций трометамола примерно от 0.5 до 2.1 % меньшей растворяющей способностью обладал смешанный растворитель, состоящий из 7.5 % *N-МП* и 92.5 % воды (Рис. 8). При уве-

Таблица 2

Содержание мелоксикама (С) в насыщенных растворах

Растворитель	С, % (м/об)	Характеристика растворимости
Изопропанол	0.04	Очень мало растворим (1 : 2500)
Этанол (96 %)	0.04	Очень мало растворим (1 : 2500)
Пропиленгликоль	0.23	Мало растворим (1 : 435)
ДМСО	5.61	Растворим (1 : 18)
<i>N-МП</i>	6.75	Растворим (1 : 15)

Таблица 3

Растворимость мелоксикама в смешанных растворителях *N-МП* — вода

Состав растворителя, % (м)		Концентрация мелоксикама, % (м/об)	Характеристика растворимости при температуре 25 °С
<i>N-МП</i>	Вода		
0	100	0.010	Практически нерастворим (1 : 10000)
5	95	0.012	Очень мало растворим (1 : 8333)
10	90	0.015	Очень мало растворим (1 : 6667)
15	85	0.020	Очень мало растворим (1 : 5000)
20	80	0.022	Очень мало растворим (1 : 4545)
30	70	0.024	Очень мало растворим (1 : 4167)
40	60	0.060	Очень мало растворим (1 : 1667)
50	50	0.064	Очень мало растворим (1 : 1563)
60	40	0.17	Мало растворим (1 : 588)
70	30	0.57	Мало растворим (1 : 175)
80	20	2.14	Умеренно растворим (1 : 47)
90	10	4.33	Растворим (1 : 23)
100	0	6.75	Растворим (1 : 15)

личении концентрации *N*-МП до 15 % содержание мелоксикама в насыщенных растворах увеличивается. Дальнейшее повышение концентрации *N*-МП до 30 % или использование смешанного растворителя, состоящего из 15 % *N*-МП, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды, практически не влияло на содержание мелоксикама в насыщенном растворе при данной концентрации трометамола. Концентрация мелоксикама в насыщенном растворе зависела от содержания трометамола, а не от состава смешанного растворителя (Рис. 8). Как следует из Рис. 8, оптимальной следует считать концентрацию *N*-МП 15 %.

При концентрации трометамола 0.35 % удается растворить около 1 % мелоксикама, при содержании трометамола около 0.7-1.0 % растворяется более 2.0-2.6 % мелоксикама, что является значимым для разработки препарата. При более высоких концентрациях трометамола растворимость мелоксикама повышается до 4-5 % и выше (Табл. 4, Рис. 8).

Состав растворителей влияет на величину рН, после превышения которой в насыщенных растворах резко увеличивается содержание со-

ли мелоксикама (Рис. 9). При увеличении концентрации *N*-МП эта величина рН смещалась из щелочной в слабокислую область, а при сочетании 15 % *N*-МП и 25 % этанола (96 %) составила около 6.0. То есть, использование такого трехкомпонентного растворителя позволяет получать растворы с достаточно высокой концентрацией мелоксикама трометамола в более широком интервале рН по сравнению с бинарными растворителями *N*-МП — вода (Рис. 9).

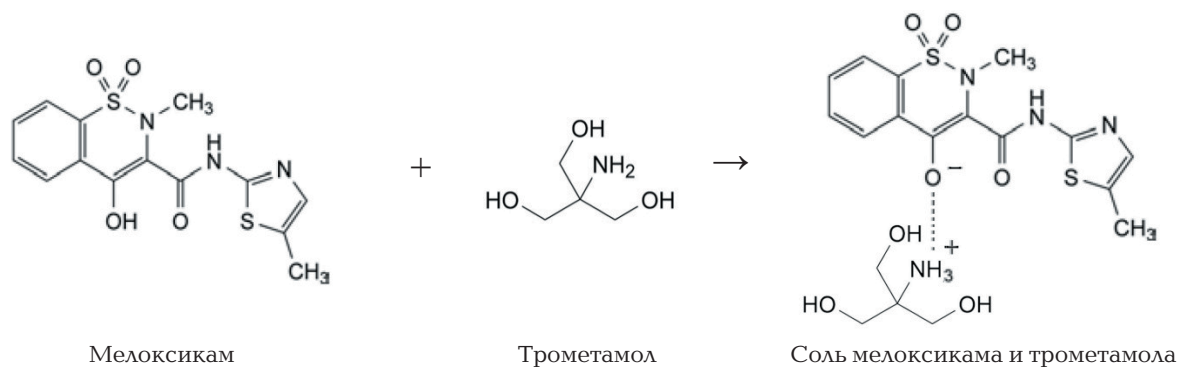
Как следует из Табл. 4, массовое соотношение между трометамолом и мелоксикамом в растворах не зависит от их концентраций и остается примерно на одном уровне — от 1 : 2.73 до 1 : 2.81 (в среднем 2.77). Молекулярная масса трометамола равна 121.1, а молекулярная масса мелоксикама — 351.4; эквимолярное массовое соотношение составляет 1.0 : 2.90. По результатам исследований (Табл. 4) для образования в растворах соли мелоксикама содержание трометамола должно превышать его эквимолярное количество примерно на 4.5 %. То есть, около 95.5 % трометамола в растворах участвует в образовании мелоксикама трометамола, а 4.5 % не-

Таблица 4

Растворимость мелоксикама (М) при температуре 25 °С в смешанном растворителе, состоящем из 60 % воды, 15 % *N*-МП и 25 % этанола (96 %), при разных концентрациях трометамола (Т) и рН раствора

Концентрация трометамола, % (Т)	рН	Концентрация мелоксикама, % (М/об)	Характеристика растворимости	Соотношение масс. Т : М
0	4.27	0.08	Очень мало растворим (1 : 1250)	—
0.10	5.66	0.28	Мало растворим (1 : 357)	1 : 2.80
0.35	6.17	0.97	Мало растворим (1 : 103)	1 : 2.77
0.60	6.36	1.64	Умеренно растворим (1 : 61)	1 : 2.73
0.85	6.52	2.34	Умеренно растворим (1 : 43)	1 : 2.75
1.11	6.68	3.07	Умеренно растворим (1 : 33)	1 : 2.77
1.36	6.78	3.82	Растворим (1 : 26)	1 : 2.81
1.605	6.89	4.43	Растворим (1 : 23)	1 : 2.76
2.00	6.99	5.55	Растворим (1 : 18)	1 : 2.78
2.095	7.00	5.81	Растворим (1 : 17)	1 : 2.77

Рисунок 6



Уравнение реакции между мелоксикамом и трометамолом в растворе

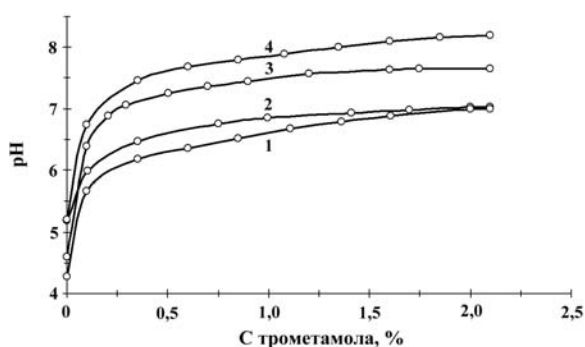
прореагировавшего трометамола способствуют повышению pH этих растворов (Рис. 7).

Результаты исследований явились частью фармацевтической разработки препарата «Амелотекс», гель для наружного применения 1 % (рег. удостоверение ЛП-002479; заявитель — ЗАО «ФармФирма "Сотекс"») [6], внедренного в серийное производство в августе 2014 г. (производитель — ООО «Озон»).

Выводы

1. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения мелок-

Рисунок 7

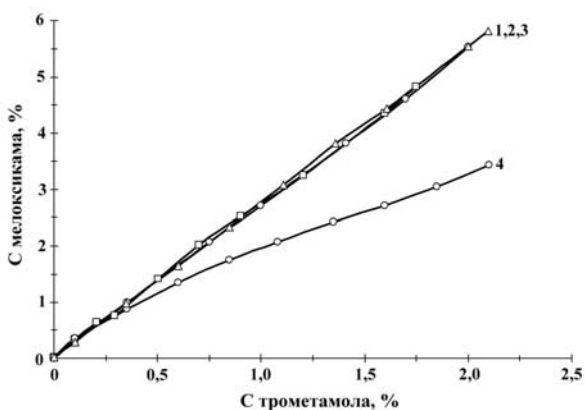


Зависимость pH насыщенных растворов мелоксикама при температуре 25 °C от концентрации (С) трометамола

Растворители:

- 1 — 15 % N-МП, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды;
- 2 — 30 % N-МП и 70 % воды;
- 3 — 15 % N-МП и 85 % воды;
- 4 — 7.5 % N-МП и 92.5 % воды.

Рисунок 8

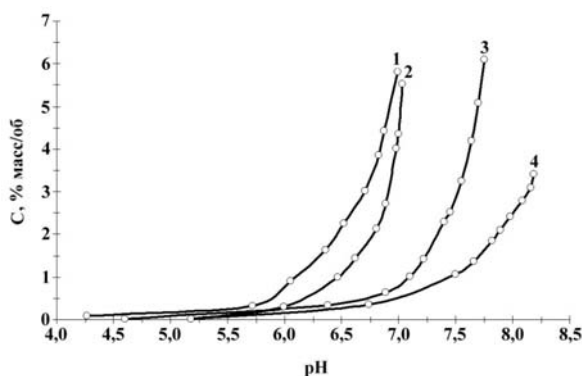


Зависимость концентрации (С) мелоксикама в насыщенных растворах при температуре 25 °C от содержания (С) трометамола

Растворители:

- 1 — 15 % N-МП, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды;
- 2 — 30 % N-МП и 70 % воды;
- 3 — 15 % N-МП и 85 % воды;
- 4 — 7.5 % N-МП и 92.5 % воды.

Рисунок 9



Зависимость концентрации (С) мелоксикама в насыщенных растворах при температуре 25 °C от pH растворов

Растворители:

- 1 — 15 % N-МП, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды;
- 2 — 30 % N-МП и 70 % воды;
- 3 — 15 % N-МП и 85 % воды;
- 4 — 7.5 % N-МП и 92.5 % воды.

сикама в растворах; корректность методики подтверждена результатами валидационных исследований.

2. Исследована растворимость мелоксикама в неводных растворителях и показано, что мелоксикам очень мало растворим в изопропанол и этаноле, мало растворим в пропиленгликоле, растворим в ДМСО и N-МП.

3. Исследована растворимость мелоксикама в смешанных растворителях N-МП — вода и установлено, что мелоксикам растворим в этих бинарных растворителях только при высоких концентрациях N-метилпирролидона, которые неприемлемы в составе гелей для кожного применения.

4. Исследована растворимость мелоксикама трометамола в смешанных растворителях вода — N-МП и вода — этанол — N-МП при разных соотношениях растворителей в зависимости от концентрации трометамола и pH. Установлено, что с ростом концентрации трометамола повышается содержание мелоксикама в насыщенных растворах и их pH. Увеличение концентрации N-МП свыше 15 % не приводит к повышению растворимости мелоксикама, которая определяется содержанием трометамола. Использование трехкомпонентного растворителя, состоящего из 15 % N-МП, 25 % этанола (96 %) и 60 % воды, позволяет получать растворы с достаточно высокой концентрацией мелоксикама трометамола в более широком диапазоне pH по сравнению с бинарными растворителями N-МП — вода. Для образования в растворах соли мелоксикама содержание трометамола должно превышать его эквимолярное

кількість приблизно на 4.5 %, що сприяє підвищенню рН розчинів.

ЛИТЕРАТУРА

1. EMEA/CHMP/167068/2004 – ICH. – Part I. – ICH Topic Q 8 (R2). – Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development, 2009.
2. CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev. 1 / Corr. – Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London, 20 January 2010.
3. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов. Глава 9 / Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Столпер Ю.М. и др. // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств (в 3 томах) / Под ред. В.П. Георгиевского. – Том 3. Метрологическое и нормативное обеспечение создания, производства и контроля качества лекарственных средств. – Харьков: НТМТ, 2011. – Т. 3. – С. 1419-1512.
4. Martindale. The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. Sweetman S.C. – London: Pharmaceutical Press, 2009. – 3694 p.
5. Новые аспекты противовоспалительной терапии ревматических болезней: теоретические предпосылки и клиническое применение мелоксикама / Насонов Е.Л., Цветкова Е.С., Балабанова Р.М. и др. // Клиническая медицина. – 1996. – № 4. – С. 1-4.
6. Государственный реестр лекарственных средств России [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/>.
7. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua/>.
8. European Pharmacopoeia. 8th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2013. – 3655 p.
9. Pharmaceutical Excipients / Eds. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen. – Pharmaceutical Press, London, 2006 (Electronic version).
10. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 58-67.
11. Исследование вязкости и термодинамики вязкого течения водных растворов *N*-метилпирролидона / Безуглая Е.П., Столпер Ю.М., Ляпунов Н.А. и др. – Фармаком. – 2010. – № 1. – С. 92-97.
12. US Pat. No US 2006/0079516 A1. – Highly concentrated stable meloxicam solutions / Henke S., Kruss B., Hassel B. et al. – Pub. Date Apr. 13, 2006. – 6 p.

УДК 547.781 + 544.016.4

Резюме

Ляпунов О.М.

Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України», Харків, Україна

Дослідження розчинності мелоксикаму та мелоксикаму трометамолу в деяких неводних та змішаних розчинниках

Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення мелоксикаму в розчинах. За цією методикою досліджено розчинність мелоксикаму в деяких неводних та змішаних розчинниках при температурі 25 °С, а також мелоксикаму трометамолу в змішаних розчинниках вода – *N*-метилпіролідон (*N*-МП) та вода – *N*-МП – етанол (96 %) залежно від їх складу, концентрації трометамолу та рН розчинів. Із збільшенням концентрації трометамолу підвищується вміст мелоксикаму в насичених розчинах та їх рН. Для отримання розчинів з достатньо високим вмістом мелоксикаму трометамолу в широкому діапа-

зоні рН раціонально використовувати змішаний розчинник *N*-МП (15 %) – етанол (25 %) – вода (60 %). Для утворення мелоксикаму трометамолу в розчинах вміст трометамолу має перевищувати його еквімолярну кількість приблизно на 4.5 %, що приводить до підвищення рН цих розчинів.

Ключові слова: мелоксикам, розчинність, розчинник, рН, аналітична методика.

UDC 547.781 + 544.016.4

Summary

Lyapunov O.M.

State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Solubility study of meloxicam and meloxicam trometamol in some non-aqueous solvents and mixed solvents

The aim of this work is a study of meloxicam and meloxicam trometamol solubility in non-aqueous and mixed solvents as a part of the pharmaceutical development of gel for cutaneous application provided dissolved form of meloxicam in formulation. The analytical procedure with using spectrophotometry method for the assay of meloxicam in the solutions was developed and validated on such characteristics as specificity, accuracy, precision, linearity and range. It was found that the analytical procedure is correct in the range of meloxicam concentrations from 2.14 mg/ml to 31.98 mg/ml. For meloxicam the absorption maximum is observed at 364 nm. Specific absorbance at a wavelength of 364 nm is (490.26 ± 0.35). It was investigated solubility of meloxicam at the temperature of 25 °C in some non-aqueous solvents such as *N*-methylpyrrolidone, ethanol (96 %), isopropyl alcohol, dimethyl sulfoxide, propylene glycol. It was determined that the best solvent for meloxicam is *N*-methylpyrrolidone. Thus, the solubility of meloxicam in a mixed solvent water – *N*-methylpyrrolidone in a wide range of compositions was studied. It was demonstrated that meloxicam amount which is significant for development of the gel, can be dissolved only at high concentration of *N*-methylpyrrolidone – about 80-100 %; these concentrations of non-aqueous solvent is not acceptable for topical preparations due to the risk of adverse effects. Therefore, it was investigated the solubility of the meloxicam salt with trometamol in mixed solvent systems water – *N*-methylpyrrolidone and water – *N*-methylpyrrolidone – ethanol (96 %) depending on their composition, content of trometamol and pH of the solutions. Meloxicam content in saturated solutions increases with increasing concentration of *N*-MP up to 15%. Increasing the concentration of *N*-methylpyrrolidone up to 30 % or addition of ethanol (96 %) does not affect the content of meloxicam in saturated solutions at a particular concentration of trometamol. With increasing concentration of trometamol the content of meloxicam in saturated solutions and their pH increase. It is reasonable to use mixed solvent *N*-MP (15 %) – ethanol (25 %) – water (60 %) to obtain solutions with sufficiently high concentration of meloxicam trometamol in a wide pH range. For the formation of meloxicam trometamol in solutions content of trometamol should exceed its equimolar amount of approximately 4.5 % resulting in higher pH of the solutions.

Keywords: meloxicam, solubility, solvent, pH, analytical procedure.

Ляпунов Алексей Николаевич (р. 1988). Окончил Национальный фармацевтический университет, факультет «Промышленная фармация» (2013). Работал старшим лаборантом лаборатории жидких и мягких лекарственных средств и аэрозолей ГНЦАС (2012-2013). Инженер отдела № 8 Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины» (2013).

Контроль якості лікарських засобів

УДК 615.07:615.22:615.453.6

Назарова О.С.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»

Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки препарату-генерика антигіпертензивної дії з лізиноприлом у формі таблеток

Проведена розробка основних показників якості препарату-генерика антигіпертензивної дії з лізиноприлом дозуванням 10 мг та 20 мг на одну таблетку для аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки. Згідно з вимогами ДФУ розроблено методики аналізу з використанням методу рідинної хроматографії для ідентифікації, визначення кількісного вмісту, оцінки однорідності дозованих одиниць та проведення випробування «Розчинення» для таблеток з лізиноприлом. Доведено придатність методики визначення супровідних домішок із використанням методу рідинної хроматографії для визначення ідентифікованих домішок лізиноприлу в лікарській формі. Вимоги, що висуваються до показників якості розроблених лікарських препаратів-генериків, є порівнянними з вимогами до референтних препаратів або перевищують їх.

Ключові слова: лізиноприл, метод рідинної хроматографії, стандартизація, фармацевтична розробка, таблетки, препарат-генерик, антигіпертензивний засіб.

Розробка і виведення на ринок препаратів-генериків, які за ефективністю, безпекою та якістю відповідають інноваційним або референтним препаратам (РП), дозволяє збільшити доступність і асортимент лікарських засобів. Забезпечення якості лікарських засобів, що розробляються, передбачає проведення фармацевтичної розробки (ФР) шляхом вдосконалення стандартизації і контролю їх якості на основі використання валідованих аналітичних методик. Перед початком ФР має бути визначений цільовий профіль якості препарату (*quality target product profile* — *QTPP*), під яким розуміють попередній набір показників якості лікарського препарату (ЛП), якого слід досягнути для гарантії бажаної якості з урахуванням безпеки та ефективності цього лікарського препарату. Критичний показник якості (*CQA*) — це фізична, хімічна, біологічна або мікробіологічна властивість або характеристика, яка для забезпечення необхідної якості продукції має знаходитися у відповідних межах, відповідному діапазоні або мати відповідний розподіл. Критичними показниками якості (*CQAs*) для твердих лікарських форм для орального застосування, як правило, є ті характеристики, що впливають на чистоту, силу дії, вивільнення лікарської речовини та стабільність препарату. Для розробки препарату та процесу слід керуватися потенційними критичними показниками якості (*CQAs*) ЛП, визначеними на основі цільового профілю якості препарату та/або попередніх наукових даних [1-3].

Нами вже були проведені роботи з аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки ряду ЛП у формі як таблеток, так і суспензії для орального застосування [4-7], які да-

ли змогу розробити і вивести на ринок України нові препарати.

Створення вітчизняного препарату-генерика антигіпертензивної дії з лізиноприлом у формі таблеток робить актуальним проведення аналітичного забезпечення ФР цієї лікарської форми.

Метою даної роботи є розробка та стандартизація методик контролю якості препаратів із субстанцією лізиноприлу дигідрату за основними показниками («Ідентифікація», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць», «Супровідні домішки», «Розчинення») для аналітичного забезпечення ФР відповідно до вимог ДФУ до лікарських препаратів у формі таблеток.

Результати дослідження та їх обговорення

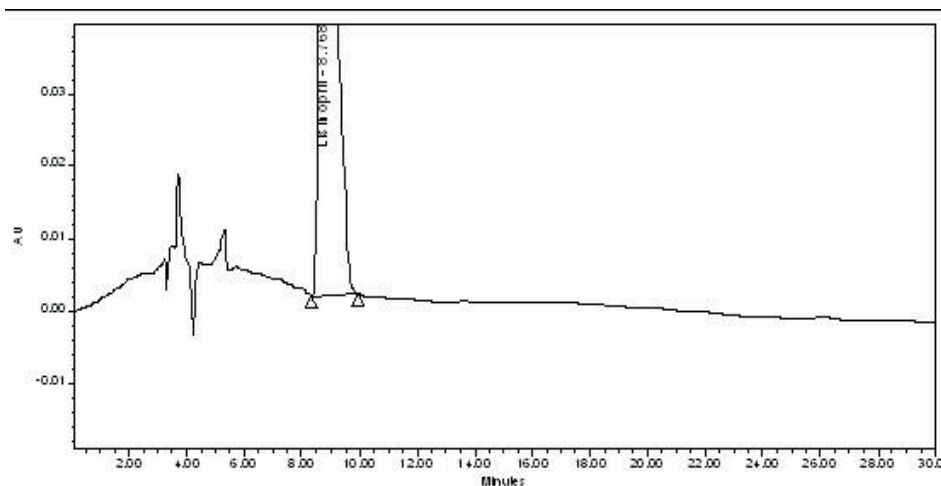
Як об'єкт дослідження вивчали субстанцію лізиноприлу дигідрату (фірма-виробник Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Китай) та препарати у формі таблеток з цією субстанцією дозуванням 10 мг та 20 мг на одну таблетку, розроблені лабораторією таблетованих лікарських засобів ДП «ДНЦЛЗ» спільно з ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод». Як РП використовували лікарський засіб «Лізиноприл-Ратіофарм[®]», таблетки по 10 мг і 20 мг (фірма Merckle GmbH, Німеччина).

Субстанція лізиноприлу дигідрату описана в Європейській Фармакопеї (ЄФ), Фармакопеї Британії (БР) та у Фармакопеї США (USP). Рівень вимог, що висуваються до субстанції в Drug Master File (DMF) фірми-виробника, відповідає рівню вимог ЄФ 7.0 [8]. Хімічна назва субстанції лізиноприлу дигідрату — (2S)-1-[(2S)-6-аміно-2-[[[(1S)-1-карбоксі-3-фенілпропіл]аміно]гексано-

л) піролідин-2-карбоксильної кислоти дигідрат. Як зазначено у ЄФ 7.0 і DMF, субстанція лізиноприлу дигідрату є кристалічним порошком білого або майже білого кольору, розчинна у воді, мало розчинна у метанолі, практично нерозчинна в ацетоні і безводному етанолі.

Аналітичні дослідження проводили методом рідинної хроматографії на хроматографі фірми Waters 2487 (США) з ультрафіолетовим детектором. Як стандарт використовували стандартний зразок (СЗ) лізиноприлу дигідрату (фірма Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, або ФСЗ ДФУ).

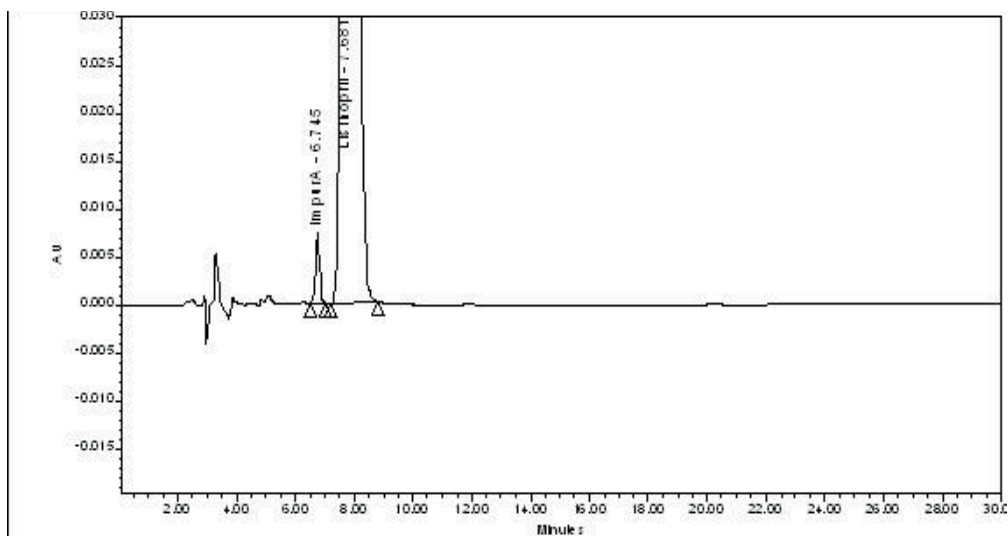
Рисунок 1



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	N-L-lisin	6.000	—	—	—
2	Impur A	7.600	—	—	—
3	Tabs Lisinop-Lug10 Impur	8.768	6578141	100.00	305160
4	Impur C	13.500	—	—	—
5	Impur D	16.000	—	—	—

Типова хроматограма випробовуваного розчину препарату, одержана у випробуваннях «Супровідні домішки»

Рисунок 2



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	Impur A	6.745	68421	1.13	6665
2	Lisinopril	7.681	5973538	98.87	308105

Типова хроматограма розчину порівняння (d) для визначення придатності тесту «Супровідні домішки»

Таблетки з лізиноприлом описані в USP 36, монографія «Lisinopril Tablets», і в ВР 2013 року, монографія «Lisinopril Tablets» [9, 10]. У Табл. 1 представлені порівняльні характеристики специфікації розробленого препарату і РП (на прикладі дози 10 мг), які свідчать, що якість РП та препарату-генерика регламентується порівняними стандартами, а основні показники якості препаратів практично ідентичні.

Кількісне визначення вмісту лізиноприлу запропоновано проводити методом рідинної хроматографії (РХ) (ДФУ, 2.2.29, 2.2.46) в таких умовах: хроматографічна колонка розміром (250 × 4.6) мм, заповнена сферичним октилсилільним силікагелем для хроматографії з розміром частинок 5 мкм (наприклад, XTerra RP8); рухома фаза — 1 г натрію 1-гексансульфонату розчиняють у 820 мл буферного розчину рН 2.0 і додають 180 мл ацетонітрилу; швидкість рухомої фази — 1 мл/хв; детектування за довжини хвилі 215 нм; температура колонки — 40 °С. Дані умови відповідають умовам визначення тесту «Кількісне визначення» монографії «Lisinopril Tablets» з USP 36. Доказ придатності умов хроматографічного визначення забезпечується введенням в методу тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи», що включає усі необхідні вимоги до аналітичної системи: на хроматограмі розчину порівняння число теоретичних тарілок має бути не менше 2000 і коефіцієнт симетрії піка лізиноприлу має бути не більше 2.5; відносне стандартне відхилення (*RSD*), розраховане для площ піків лізиноприлу, має відповідати вимогам ДФУ, 2.2.46, до *RSD*. Збіг часів утримування піків лізиноприлу на хроматограмах випробовуваного розчину та хроматограмах розчину СЗ лізиноприлу дигідрату підтверджує ідентичність цієї речовини в препараті. Час утримування піка лізиноприлу — близько 8 хв. Нами розроблена методика пробопідготовки випробовуваного розчину препарату з урахуванням особливостей складу та технології виготовлення препарату, що розробляється: близько 0.32 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл суміші розчинників вода — метанол (4:1), витримують на ультразвуковій бані протягом 10 хв, збовтують протягом 20 хв, доводять об'єм тією ж сумішшю розчинників до позначки, перемішують, фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату, і фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Ця пробопідготовка є найбільш

раціональною для досягнення необхідного ступеня витягання діючої речовини.

На основі результатів кількісного визначення лізиноприлу у препаратах, а також вимог ДФУ визначено допустимі межі вмісту лізиноприлу: на момент випуску — $\pm 5\%$ від номінального вмісту, протягом терміну зберігання — $\pm 10\%$ від номінального вмісту, розраховуючи на середню масу таблетки, що відповідає межах вмісту діючої речовини в РП.

В зазначених вище умовах запропоновано та апробовано також кількісне визначення лізиноприлу методом РХ в таких випробуваннях, як «Розчинення» і «Однорідність дозованих одиниць», а також «Супровідні домішки».

Тест «Розчинення» у препаратах проводять відповідно до вимог ДФУ, використовуючи прилад із лопаттю (швидкість обертання — 50 об/хв), середовище розчинення — 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти, час розчинення — 30 хв. Відповідно до вимог монографії «Lisinopril Tablets» USP 36 і специфікації на РП «Лізиноприл-Ратіофарм[®]», таблетки по 10 мг (Табл. 1), висуваються такі вимоги до тесту «Розчинення» — не менше 80 % за 30 хв. У зв'язку з цим до препарату-генерика висунуті аналогічні вимоги.

Відповідно до вимог ДФУ, 2.9.40, для таблеток, які містять діючу речовину в кількості 25 мг і менше, обов'язковим є випробування на однорідність дозованих одиниць. Визначення проводять методом прямого кількісного визначення з використанням РХ аналогічно кількісному визначенню. Розраховують приймальне число *AV* відповідно до ДФУ 1.2, с. 182, Табл. 2.9.40.-2, використовуючи як опорне значення *M*, випадок 1. Нормування за показником «Однорідність дозованих одиниць» наведено в Табл. 1. В РП даний показник відсутній (Табл. 1), замість нього введений показник «Однорідність маси». Нами в свою чергу в специфікацію на препарат-генерик введено ці два показники, що дозволяє більш ретельно контролювати як проміжний продукт (таблетки нерозфасовані) за показником «Однорідність маси» для налаштування обладнання та контролю в умовах виробництва, так і готовий лікарський засіб за показником «Однорідність дозованих одиниць» з використанням методу рідинної хроматографії.

Відповідно до специфікації на РП «Лізиноприл-Ратіофарм[®]», таблетки по 10 мг (Табл. 1), визначаються методом РХ і нормуються такі домішки: будь-яка відома домішка — не більше 0.3 %; будь-яка інша домішка — не більше 0.2 %; сума інших домішок — не більше 0.5 %. Відповідно до вимог монографії «Lisinopril Tablets»

Таблиця 1

Показники якості таблеток з лізиноприлом відповідно до проекту МКЯ, сертифікату якості препарату «Лізиноприл-Ратіофарм®», таблетки по 10 мг, виробництва фірми Merckle Gmb, Німеччина, та монографії USP 36

Найменування показників	Проект МКЯ	Сертифікат якості препарату «Лізиноприл-Ратіофарм®», таблетки по 10 мг	Монографія USP 36 «Lisinopril Tablets»
Опис	Таблетки білого або майже білого кольору, плоскоциліндричної форми з фаскою і рискою. На поверхні таблеток допускається мармуровість.	Таблетки світло-рожеві, неоднорідно забарвлені (з «мармуровістю»), круглі, двоопуклі, з лінією розлому на одній стороні (діаметр — 7.0 мм).	—
Ідентифікація Лізиноприл	РХ: На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманій в розділі «Кількісне визначення», час утримування основного піка лізиноприлу має збігатися з часом утримування піка лізиноприлу на хроматограмі розчину порівняння.	РХ: Час утримування відповідає стандарту порівняння.	РХ: Час утримування основного піка випробовуваного розчину відповідає стандартному розчину при кількісному визначенні.
Барвник	Барвник відсутній в складі препарату.	Заліза оксид (кольорова реакція): червоне забарвлення.	—
Середня маса	Від 152.0 мг до 168.0 мг (160.0 мг \pm 5 %).	140 мг \pm 3 %	—
Однорідність маси	Не більше \pm 7.5 % від середньої маси таблетки (ДФУ 1.1, 2.9.5).	Відповідно до вимог ЄФ, 2.9.5.	—
Стийкість таблеток до роздавлювання	—	40-90 N (ЄФ, 2.9.8)	—
Стираність	—	\leq 1 % (ЄФ, 2.9.7)	—
Однорідність дозованих одиниць	Вимоги вважаються виконаними, якщо приймальне число для 10 таблеток менше або дорівнює 15 або кінцеве приймальне число, розраховане для 30 таблеток, менше або дорівнює 15 і кожний індивідуальний вміст таблетки становить не менше $(1 - 0.25) \times M$ і не більше $(1 + 0.25) \times M$ (РХ).	—	USP <905> (РХ)
Розпадання	Не більше 15 хв.	—	—
Розчинність	80 % (Q) лізиноприлу через 30 хв (РХ).	80 % (Q) лізиноприлу через 30 хв (ЄФ, 2.9.3; РХ).	Не менше 80 % (Q) за 30 хв (РХ).



USP 36 допускається сума домішок — не більше 2.0 %. Для визначення кількості супровідних домішок у препараті-генеріку також запропоновано використовувати метод РХ (ДФУ, 2.2.29, 2.2.46) в умовах, описаних у розділі «Кількісне

визначення». Дані умови відповідають умовам визначення тесту «Супровідні домішки» для таблеток лізиноприлу відповідно до USP 36. Для доказу придатності умов хроматографічного визначення супровідних домішок у препараті

Таблиця 1 (продовження)

Найменування показників	Проект МКЯ	Сертифікат якості препарату «Лізиноприл-Ратіофарм» [®] , таблетки по 10 мг	Монографія USP 36 «Lisinopril Tablets»
Супровідні домішки — протягом терміну придатності	РХ: домішки А — не більше 0.3 %; домішки D — не більше 0.3 %; домішки С — не більше 1.5 %; домішки Na-[(1S)-1-карбоксі-3-фенілпропіл]-L-лізину — не більше 0.3 %; будь-якої неідентифікованої домішки — не більше 0.2 % кожної; суми будь-яких неідентифікованих домішок — не більше 1.0 %; сума домішок — не більше 2.0 %.	РХ: будь-яка відома домішка — не більше 0.3 %; будь-яка інша домішка — не більше 0.2 %; сума інших домішок — не більше 0.5 %.	РХ: сума домішок — не більше 2.0 %.
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) — не більше 10 ³ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ГУМС) — не більше 10 ² КУО/г. Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г.	Відповідно до вимог ЄФ, 5.1.4.	Відповідно до вимог USP.
Кількісне визначення — на момент випуску	Вміст лізиноприлу (C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₃) в 1 таблетці:		
— протягом терміну придатності	РХ: від 9.5 мг до 10.5 мг (95-105 %)	РХ: 10.0 мг ± 5 %	РХ: 90-110 %
	від 9.0 мг до 11.0 мг (90-110 %)		

нами, на відміну від USP 36, запропоновано введення додаткової вимоги, за найбільш критичним ступенем розділення піків, а саме: на хроматограмі розчину порівняння (d) ступінь розділення піків лізиноприлу і домішки А ((2RS)-2-аміно-4-фенілбутанової кислоти) має бути не менше 1.3. Нами проведена ідентифікація ряду домішок лізиноприлу дигідрату в даних хроматографічних умовах і встановлено, що на хроматограмі випробовуваного розчину відносний час утримування по відношенню до основного піка лізиноприлу (час утримування прийнято за 1.0) для домішки Na-[(1S)-1-карбоксі-3-фенілпропіл]-L-лізину — близько 0.7; домішки А — близько 0.9; домішки С (S,S,S-дикетопіперазину) — близько 1.6; домішки D (R,S,S-дикетопіперазину) — близько 1.8. Таким чином, запропонована ними методика дає змогу визначати ідентифіковані домішки, а не суму домішок, як це запропоновано в USP 36 для таблеток лізиноприлу. Вміст індивідуальних домішок і суми домішок нормується на рівні, аналогічному РП (див. Табл. 1). Типові хроматограми випробовуваного розчину і розчину для визначення придатності хроматографічної системи (розчину порівняння (d)), одержані у випробуваннях «Супровідні домішки», наведено на Рис. 1 і 2. Відповідність нормуванню вмісту домішок підтверджується

протягом усього терміну придатності, про що свідчать дані з вивчення стабільності.

Таким чином, на основі проведених досліджень визначено одну зі складових цільового профілю якості препарату-генерика з лізиноприлом у формі таблеток — критерії якості та запропоновані межі для таких критичних показників якості препарату, як «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць», «Супровідні домішки» та «Розчинення» (Табл. 1, проект МКЯ).

Висновки

1. Для аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки препаратів-генериків розроблено та стандартизовано методики ідентифікації, кількісного визначення лізиноприлу дигідрату в таблетках та методики випробувань «Розчинення» і «Однорідність дозованих одиниць» в готовій лікарській формі з використанням методу рідинної хроматографії.
2. Розроблено та доведено придатність методики визначення ідентифікованих супровідних домішок у таблетках з лізиноприлом методом рідинної хроматографії.
3. Запропоновані методики контролю, показники якості та критерії прийнятності для

дозованої лікарської форми з лізиноприлом введено до проекту Методів контролю якості препаратів-генериків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Настанова 42-3.0:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Підпрудничков та ін. — Київ, МОЗ України, 2011. — 42 с.
2. Настанова 42-3.2:2004. Настанови з якості. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності / В. Георгієвський, М. Ляпунов, О. Безугла та ін. — Київ, МОЗ України, 2004. — 38 с.
3. Ляпунов Н.А. Методология фармацевтической разработки лекарственных препаратов в Украине / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая // Фармація. — 2013. — № 7. — С. 44-49.
4. Бобрицька Л.О. Забезпечення якості фармацевтичної розробки препарату «Герпепвал 500» / Л.О. Бобрицька, О.С. Назарова, Ю.М. Вербова // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2011. — № 2 (16). — С. 10-15.
5. Бобрицька Л.О. Забезпечення якості фармацевтичної розробки препарату «Мерадазол» / Л.О. Бобрицька, О.С. Назарова, Ю.М. Вербова // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2012. — № 1 (21). — С. 18-23.
6. Назарова О.С. Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки таблеток кандесартану цилексетилу / О.С. Назарова, Ю.М. Вербова, Р.П. Калинюк // Фармаком. — 2013. — № 3. — С. 18-24.
7. Назарова О.С. Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки препаратів з ніфуроксазидом в формі суспензії для орального застосування / О.С. Назарова, Ю.М. Вербова, Л.Г. Алмакаєва та ін. // Фармаком. — 2014. — № 4. — С. 45-55.
8. European Pharmacopoeia. Vol. 1-2. — 7th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2011.
9. The United States Pharmacopoeia 36th ed. — National Formulary 31th ed. — USP 36-NF 31. — Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention [Електронний ресурс] / The British Pharmacopoeia secretariat. — London, 2013. — CD-ROM.

УДК 615.07:615.22:615.453.6

Резюме

Назарова Е.С.

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

Аналитическое обеспечение фармацевтической разработки препарата-генерика антигипертензивного действия с лизиноприлом в форме таблеток

Проведена разработка основных показателей качества препарата-генерика антигипертензивного действия с лизиноприлом дозировкой 10 мг и 20 мг в одной таблетке для аналитического обеспечения фармацевтической разработки. В соответствии с требованиями ГФУ разработаны методики анализа с использованием метода жидкостной хроматографии для идентификации, определения количественного содержания, оценки однородности дозированных единиц и проведения испытания «Растворение» для

таблеток с лизиноприлом. Доказана пригодность методики определения сопутствующих примесей с использованием метода жидкостной хроматографии для определения идентифицированных примесей лизиноприла в лекарственной форме. Требования, предъявляемые к показателям качества разработанных лекарственных препаратов-генериков, являются сравнимыми с требованиями к референтным препаратам или превышают их.

Ключевые слова: лизиноприл, метод жидкостной хроматографии, стандартизация, фармацевтическая разработка, таблетки, препарат-генерик, антигипертензивное средство.

UDC 615.07:615.22:615.453.6

Summary

Nazarova O.S.

State Enterprise «State Scientific Centre for Drugs and Medical Product», Kharkov

Analytical support pharmaceutical development of generic drugs antihypertensive action of lisinopril in tablet form

Presented analytical support for the pharmaceutical development of the main indicators of the quality of generic drugs to the antihypertensive effect of lisinopril 10 mg and 20 mg per tablet. In accordance with the techniques developed State Pharmacopoeia of Ukraine analysis using liquid chromatography method for identifying, quantifying the content of evaluating uniformity of dosage units and the test «Dissolution» of lisinopril tablets. Quantitative determination of lisinopril proposed to carry out by liquid chromatography under the following conditions: chromatographic column (250 × 4.6) mm filled octylsilyl spherical silica gel for chromatography with a particle size of 5 microns (e.g. XTerra RP8); mobile phase: 1 g sodium 1-geksansulfonate dissolved in 820 ml buffer pH 2.0 and added to 180 ml of acetonitrile; mobile phase rate — 1 ml/min; detection at 215 nm; column temperature — 40 °C. These conditions correspond to the conditions determining the quantitative determination of the test according to monograph «Lisinopril Tablets» USP 36. Coincidence lisinopril retention times of peaks in the chromatograms of test solution and reference solution chromatograms lisinopril dihydrate confirms the identity of the substance in the preparation. Proven methods for determining the suitability of accompanying impurities using liquid chromatography method for determination of impurities identified lisinopril in the formulation. Based on the studies identified components of the target profile quality generic lisinopril in the form of tablets — quality criteria and proposed limits for such a critical indicator of quality of the drug as «Assay», «Uniformity of dosage units», «Related substances» and «Dissolution». Requirements for quality indicators developed generic drugs is comparable to the reference product or higher.

Keywords: lisinopril, liquid chromatography method, standardization and development of pharmaceutical tablets, generic drugs, antihypertensive agent.

Назарова Олена Сергіївна. Зав. лабораторії аналізу, якості та стандартизації лікарських препаратів Державного підприємства «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (2009). К.фарм.н. (2005).

УДК 543.422.3–76:547.792'367

Одинцова В.М.

Запорізький державний медичний університет

Ультрафіолетова спектрофотометрія похідних 5-(адамтан-1-іл)-4R-1,2,4-тріазол-3-тіонів

Вивчені ультрафіолетові спектри світлопоглинання 5-(адамтан-1-іл)-4-метил-1,2,4-тріазол-3-тіону (сполука I) та 5-(адамтан-1-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (сполука II) у розчинниках різної полярності з метою встановлення залежності характеру УФ-спектрів від будови сполук, які вивчаються, та полярності використаних розчинників. Встановлено, що смуга поглинання сполуки I зумовлена $\pi \rightarrow \pi^*$ сполученням у 1,2,4-тріазоловому циклі, а смуга сполуки II є результатом накладення $\pi \rightarrow \pi^*$ сполучення 1,2,4-тріазолового циклу на 1L_b -смугу фенільного радикала.

Встановлено, що досліджувані сполуки у нейтральному і кислому середовищах (вода, 95 % етанол, 0.1 М розчин HCl і 0.1 М розчин H₂SO₄) існують у тіонній формі. У лужному середовищі (0.1 М розчин NaOH) вони існують у вигляді тіолів.

Ключові слова: ультрафіолетові спектри, похідні 1,2,4-тріазол-3-тіонів, тіон-тіольна таутомерія, полярність розчинників.

Вступ

Впровадження в терапевтичну практику нових вітчизняних лікарських засобів — одне з найважливіших завдань фармацевтичної хімії. Головним етапом створення оригінальних лікарських препаратів для лікування патології серцево-судинної і нервової систем, щитовидної залози, туберкульозу, запальних процесів тощо є цілеспрямований синтез біологічно активних речовин з вираженим фармакологічним ефектом, мінімальними побічними діями, низькою токсичністю.

Ретельне дослідження сучасної наукової літератури показує, що значним досягненням у напрямку створення нових високоефективних лікарських субстанцій є синтез гетероциклічних сполук, а саме похідних 1,2,4-тріазолу. Монографія М.І. Барміна та В.В. Мельникова присвячена питанням синтезу, властивостей та застосування біс-(аміно-1,2,4-тріазоліл і тетразоліл) алканів та їх похідних. Дослідження концепції аміно-імінної таутомерії аміно-1,2,4-тріазоліл та тетразоліл алканів дозволило зробити висновок, що аміно-імінна рівновага зрушується у бік іміноформи при підвищенні полярності розчинників. Для доказу структури синтезованих сполук автори монографії використали ГЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопію [1].

Дослідженню тіон-тіольної таутомерії похідних 1,2,4-тріазол-3(5)-тіонів методом УФ-спектрофотометрії були присвячені наукові роботи О.І. Панасенко та співавторів [2, 3], А.Г. Каплаушенко [4] та В.В. Парченко [5]. Для вирішення цього питання був також використаний метод високоефективної рідинної хроматографії із мас-детектуванням [6].

Структура 1,2,4-тріазолу є фрагментом багатьох синтетичних лікарських засобів, серед яких можна назвати інтраконазол, ворикона-

зол, рибавірин, тразадон, летрозол, а також новий оригінальний препарат тіотріазолін, який має гепатопротекторну, кардіопротекторну, ранозагоюючу та противірусну активність [7, 8, 9, 10].

Молекула адамтану містить у собі конденсовану систему, яка складається з трьох циклогексанових кілець, що мають конформацію у вигляді крісла. Просторове розташування атомів вуглецю відповідає кристалічній решітці алмазу [11]. Деякі похідні адамтану (ремантадин, адапромін) застосовуються у медичній практиці як лікарські засоби із досить сильною противірусною дією [10].

Мета роботи

Метою дослідження є вивчення ультрафіолетових спектрів поглинання сполук I та II у воді, 95 % спирті етиловому, 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, 0.1 М розчині кислоти сірчаної, 0.1 М розчині натрію гідроксиду та *n*-гексані для встановлення залежності характеру спектрів від природи розчинників і виявлення електронної природи структури досліджуваних сполук.

Матеріали та методи дослідження

Ступінь чистоти досліджуваних сполук перевіряли методом тонкошарової хроматографії після неодноразової перекристалізації, досягнення сталості результатів елементного аналізу та температури плавлення за методиками Державної Фармакопеї України [9]. Використані реагенти та розчинники мали кваліфікацію «хімічно чисті» і повністю відповідали вимогам до абсорбційного спектрофотометричного аналізу в ультрафіолетовій та видимій областях [12].

Вимірювання УФ-спектрів досліджуваних сполук здійснювалось за допомогою спектрофотометра «SPECORD 200» 222U241, Німеч-

чина, у кюветах з товщиною шару 10 мм. Результати дослідження УФ-спектрів похідних 5-(адамтан-1-іл)-4R-1,2,4-тріазол-3-тіонів наведені у Табл. 1.

Досліджувані речовини — це складні органічні сполуки, у яких один зі структурних фрагментів молекули являє собою 1,2,4-тріазол-3-тіон, а інший — адамтан.

Експериментальні дані з вивчення сполуки I (Табл. 1) свідчать, що УФ-спектри даної сполуки характеризуються однією смугою поглинання середньої інтенсивності з максимумами в межах від 236 нм ($\epsilon_{\max} = 2\,240$, розчинник — 0.1 М NaOH) до 255 нм ($\epsilon_{\max} = 2\,500$, розчинники — 95 % спирт етиловий та *n*-гексан). Через те що конденсована система адамтану проявляє вибіркоче світлопоглинання тільки у вакуумній частині електромагнітного спектра в межах 180 нм [13] і вона не сполучена із 1,2,4-тріазоловим циклом, смуга вбирання сполуки I обумовлена лише переходами електронів у тріазоловому кільці разом із його субституентами

(метильна та тіольна групи). Сам по собі 1,2,4-тріазол у воді характеризується максимумом при 187 нм ($\epsilon_{\max} = 3\,300$), а у нашому випадку атомне угруповання у вигляді 4-метил-1,2,4-тріазол-3-тіону у водному розчині проявляє максимум при 248 нм ($\epsilon_{\max} = 2\,300$). Згідно з правилом Вудварда [14] до положення максимуму 1,2,4-тріазолу, як родоначального хромофора, слід додати інкремент до значення максимуму вихідної структури (187 нм) (Рис. 1).

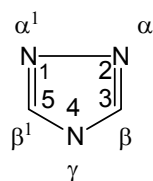
У молекулі сполуки I $\alpha = \alpha^1 = 0$; $\beta = 12$ нм; $\beta^1 = 3 \times 12 = 36$ нм; $\gamma = 12$ нм [15]. Отже, максимум досліджуваної сполуки теоретично знаходиться при $187 + 12 + 3 \times 12 + 12 = 247$ нм, а ми практично спостерігаємо його при 248 нм. Таке незначне зміщення цього максимуму на +1 нм можливо пояснити утворенням водневого зв'язку із розчинником. Як і слід було очікувати, при застосуванні 95 % спирту етилового як розчинника максимум досліджуваної сполуки знаходиться при 255 нм (Табл. 1).

Таблиця 1

Спектральна характеристика похідних 5-(адамтан-1-іл)-4R-1,2,4-тріазол-3-тіонів

Аналізована сполука	Концентрація, розчинник	M	λ , нм	ϵ	Ig ϵ	Переходи електронів
5-(адамтан-1-іл)-4-метил-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука I)	1 мг% у воді, 4.01×10^{-5} М	249.38	248	2300	3.36	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
—//—//—	1 мг% у 95 % етанолі, 4.01×10^{-5} М	—//—	255	2500	3.39	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
—//—//—	1 мг% у 0.1 М HCl, 4.01×10^{-5} М	—//—	248	2500	3.39	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
—//—//—	1 мг% у 0.1 М H ₂ SO ₄ , 4.01×10^{-5} М	—//—	246	1300	3.11	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
—//—//—	1 мг% у 0.1 М NaOH, 4.01×10^{-5} М	—//—	236	2240	3.35	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
—//—//—	1 мг% у <i>n</i> -гексані, 4.01×10^{-5} М	—//—	255	2500	3.39	$\pi \rightarrow \pi^x$ перехід
5-(адамтан-1-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука II)	1 мг% у воді, 3.18×10^{-5} М	314.44	255	13270	4.12	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги
—//—//—	1 мг% у 95 % етанолі, 3.18×10^{-5} М	—//—	260	11320	4.05	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги
—//—//—	1 мг% у 0.1 М HCl, 3.18×10^{-5} М	—//—	260	11160	4.04	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги
—//—//—	1 мг% у 0.1 М H ₂ SO ₄ , 3.18×10^{-5} М	—//—	262	10690	4.03	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги
—//—//—	1 мг% у 0.1 М NaOH, 3.18×10^{-5} М	—//—	250	9430	3.97	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги
—//—//—	1 мг% у <i>n</i> -гексані, 3.18×10^{-5} М	—//—	256	9400	3.97	накладання $\pi \rightarrow \pi^x$ сполучення та ¹ L _b -смуги

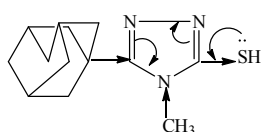
Рисунок 1



Електронна будова 1,2,4-тріазолу

Отже, на підставі електронної будови 1,2,4-тріазолу (Рис. 1) слід зробити висновок, що в молекулі сполуки I відбуваються $\pi \rightarrow \pi^*$ переходи електронів (Рис. 2), які обумовлюють світлопоглинання у межах (236-255) нм (Табл. 1).

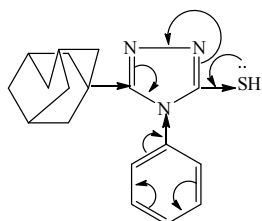
Рисунок 2



Переходи електронів у молекулі 5-(адамантан-1-іл)-4-метил-1,2,4-тріазол-3-тіону

Наявність фенільного субституєнта у положенні 4 відрізняє сполуку II від сполуки I, у якої в четвертому положенні знаходиться метильний радикал (Рис. 3).

Рисунок 3



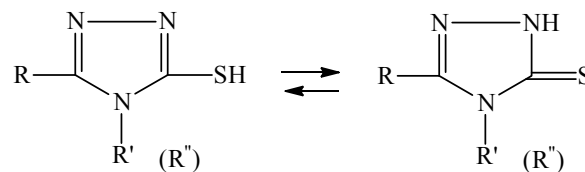
Переходи електронів у молекулі 5-(адамантан-1-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону

Дані експерименту з вивчення ультрафіолетових спектрів сполуки II в обраних розчинниках свідчать, що смуги, які ми спостерігаємо, характеризуються вибірковою світлопоглинанням з максимумами у межах від 255 нм ($\epsilon_{\max} = 13\ 270$, вода) до 262 нм ($\epsilon_{\max} = 10\ 690$, 0.1 М сірчана кислота), а їх інтенсивність значно вище, ніж у сполуки I (Табл. 1).

Враховуючи будову сполуки II і характер спектрів поглинання, а також електронні переходи у її молекулі (Рис. 3), маємо усі підстави зробити висновок, що смуга, яку спостерігаємо, є результатом накладання $\pi \rightarrow \pi^*$ переходів у 1,2,4-тріазоловому циклі на смугу поглинання фенільного радикала. Це обумовлено переходом електронів між симетричними основним та збудженим станами. Згідно з класифікацією Kleven, Plat [16] у науковій літературі вона позначається як 1L_b -смуга.

Характерною рисою сполук I та II є наявність у 1,2,4-тріазоловому фрагменті обох молекул у положенні 3-тіольного угруповання. Зміна інтенсивності та положення максимумів обох сполук свідчить про наявність в обох випадках тіон-тіольної таутомерії. З Табл. 1 видно, що у нейтральних розчинниках (вода, 95 % спирт етиловий, *n*-гексан) має перевагу тіонна форма, оскільки λ_{\max} сполуки I знаходиться у межах від 248 нм (вода) до 255 нм (95 % етанол та *n*-гексан), а для сполуки II — в межах від 255 нм (вода) до 260 нм (95 % етанол). В обох випадках положення максимуму у лужному розчиннику зрушено гіпсохромно, що свідчить про зміщення тіон-тіольної рівноваги у бік «кислотної» тіольної форми із утворенням S-натрієвого похідного [17].

Рисунок 4



R-адамантан, R'-метил, R''-феніл

Тіон-тіольна таутомерія похідних 5-(адамантан-1-іл)-4R-1,2,4-тріазол-3-тіонів

Згідно з отриманими даними досліджувані сполуки у кислому середовищі існують у тіольній формі [18].

Висновки

Вивчені УФ-спектри поглинання 5-(адамантан-1-іл)-4-метил-1,2,4-тріазол-3-тіону (сполука I) і 5-(адамантан-1-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (сполука II) у розчинниках з різною полярністю (вода, 95 % спирт етиловий, 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти, 0.1 М розчин сірчаної кислоти, 0.1 М розчин натрію гідроксиду та *n*-гексан).

Встановлено, що для досліджуваних сполук характерна одна смуга поглинання середньої інтенсивності з максимумами у межах від 236 до 255 нм (сполука I) та від 250 до 262 нм (сполука II).

Виходячи з характеру спектрів виявлено, що смуга поглинання сполуки I зумовлена $\pi \rightarrow \pi^*$ сполученням у 1,2,4-тріазоловому циклі. Смуга поглинання сполуки II обумовлена накладанням $\pi \rightarrow \pi^*$ сполучення на 1L_b -смугу фенільного радикала.

Досліджувані сполуки у нейтральних розчинниках (вода, 95 % спирт етиловий), а також у кислому середовищі (0.1 М HCl і 0.1 М H₂SO₄) існують у тіонній формі, а їх тіольна форма ха-

рактерна для розчинів у лужному середовищі (0.1 М NaOH).

ЛІТЕРАТУРА

- Бармин М.И. Новые amino-1,2,4-триазолил и тетразолил алканы: монография / М.И. Бармин, В.В. Мельников. — СПб: СПГУТД, 2002. — 240 с.
- Панасенко О.І. Дослідження тіон-тіольної таутомерії деяких похідних 1,2,4-триазол-5-тіонів / О.І. Панасенко, В.П. Буряк, Є.Г. Книш // Запорозький медичинський журнал. — 2004. — № 4 (25). — С. 144-146.
- Електронні спектри вбирання та дослідження тіон-тіольної таутомерії похідних 4-R-3-(тіофен-2-іл)-1н-1,2,4-триазол-5(4н)-тіону / В.О. Саліонов, В.П. Буряк, О.І. Панасенко [та ін.] // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. — 2012. — № 3 (10). — С. 57-60.
- Спектральна характеристика 5-R-4-R1-1,2,4-триазол-3-тіонів / А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш [та ін.] // Медична хімія. — 2009. — № 2 (11). — С. 79-85.
- Спектральна характеристика та вивчення тіон-тіольної таутомерії 4-алкіл- та арилпохідних 5-(фуран-2-іл)-4R-1,2,4-триазол-3-тіону / В.В. Парченко, В.П. Буряк, О.І. Панасенко [та ін.] // Запорозький медичинський журнал. — 2008. — № 6. — С. 91-95.
- The study of thione-thiol tautomerism of 5-(2-, 3-, 4-nitrophenyl)-4-amino-3-thio-1,2,4-triazole by hplc-ms method / V.A. Varynskyi, M.A. Shcherbak, A.G. Kaplaushenko, I.A. Yurchenko // Jour. of Chem. and Pharm. Research. — 2014. — № 6. — P. 1342-1350.
- Туркевич М.М. Фармацевтична хімія (стероїдні гормони, їх синтетичні замінники і гетероциклічні сполуки як лікарські засоби): підр. [для студ. вищ. фармац. закл. освіти та фармац. факульт. вищих медич. заклад. освіти III-IV рівнів акредитації] / М.М. Туркевич, О.В. Владзімірська, Р.Б. Лесик; [за ред. Б.С. Зіменковського]. — Вінниця: Нова Книга, 2003. — 464 с.
- Мазур І.А. Тиотриазолин: фармакологіческие аспекты и клиническое применение / Мазур И.А., Волошин Н.А., Некман И.С. и др. — Львов: Наутилус, 2005. — 156 с.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с. — Доповнення 2. — 2008. — 620 с. — Доповнення 3. — 2009. — 280 с. — Доповнення 4. — 2011. — 540 с.
- Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua/>.
- Ластухін Ю.О. Органічна хімія: підр. [для студ. вищ. навч. закл.] / Ю.О. Ластухін, С.А. Воронов. — Львів: Центр Європи, 2006. — 864 с.
- 2.2.25. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій областях // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 36-41. — Доповнення 2. — 2008. — С. 50-55.
- Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова. — 2-е изд., перераб. — Л.: Химия, 1985. — 248 с.
- Сильверстейн Р. Спектрофотометрическая идентификация органических соединений / Сильверстейн Р., Баселер Т., Моррил Т. — М.: Мир, 1977. — 590 с.
- Штерн Э. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии / Э. Штерн, К. Тиммонс. — М.: Мир, 1974. — 295 с.
- Klevens H.V. Spectral resemblances of catacondensed hydrocarbons / H.V. Klevens, J.R. Plat // J. Chem. Phys. — 1949. — Vol. 17, № 5. — P. 470-481.
- Большаков Г.Ф. Ультрафиолетовые спектры гетероароматических соединений / Большаков Г.Ф., Ватаго В.С., Агрест Ф.Б. — Л.: Химия, 1969. — 504 с.
18. Похідні 4-аміно та 3-тіо-1,2,4-триазолу як потенційні лікарські засоби / [Колесник Ю.М., Каплаушенко А.Г., Книш Є.Г. та ін.]. — Запоріжжя, 2014. — 273 с.

УДК 543.422.3 – 76 : 547.792'367

Резюме

Одинцова В.Н.

Запорозький державний медичинський університет

Ультрафіолетова спектрофотометрія производних 5-(адамтан-1-іл)-4R-1,2,4-триазол-3-тіонів

Изучены ультрафиолетовые спектры светопоглощения 5-(адамтан-1-іл)-4-метил-1,2,4-триазол-3-тіона (соединение I) и 5-(адамтан-1-іл)-4-фенил-1,2,4-триазол-3-тіона (соединение II) в растворителях различной полярности с целью выявления зависимости характера УФ-спектров от строения изучаемых соединений и полярности использованных растворителей. Установлено, что полоса поглощения соединения I обусловлена $\pi \rightarrow \pi^*$ сопряжением в 1,2,4-триазоловом цикле, а полоса соединения II является результатом наложения $\pi \rightarrow \pi^*$ сопряжения 1,2,4-триазолового цикла на 1L_b -полосу фенильного радикала.

Установлено, что изучаемые соединения в нейтральной и кислых средах (вода, 95 % этанол, 0.1 М раствор HCl и 0.1 М раствор H₂SO₄) существуют в тионной форме. В щелочной среде (0.1 М раствор NaOH) они существуют в виде тиолов.

Ключевые слова: ультрафиолетовые спектры, производные 1,2,4-триазол-3-тіонів, тион-тіольная таутомерия, полярность растворителей.

UDC 543.422.3 – 76 : 547.792'367

Summary

Odyntsova V.M.

Zaporozhye State Medical University

Ultraviolet spectrophotometry of 5-(adamantane-1-yl)-4R-1,2,4-triazole-3-thions derivatives

It is studied ultraviolet spectra of light absorption of some derivatives of 5-(adamantane-1-yl)-4R-1,2,4-triazole-3-thions, namely 5-(adamantane-1-yl)-4-methyl-1,2,4-triazole-3-thion (compound I) and 5-(adamantane-1-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazole-3-thion (compound II) in solvents of different polarity (water, 95 % of ethanol, 0.1 M solution of hydrochloric acid, 0.1 M solution of sulfuric acid, 0.1 M solution of sodium hydroxide and *n*-hexane) to establish the dependence of the nature of the ultraviolet spectra from the structure of the studied compounds and the polarity of the used solvents. It is established that the absorption band of compound I is caused by $\pi \rightarrow \pi^*$ conjugation in 1,2,4-triazole cycle and strip of compound II is the result of $\pi \rightarrow \pi^*$ conjugation applying in 1,2,4-triazole cycle at 1L_b — the band of the phenyl radical.

The change intensity of the observed electronic spectra and the position of their maxima indicate to the existence of the thione-thiol tautomerism of the investigated compounds depending on the nature of the used solvents. It is detected that the studied compounds at neutral and acidic media (water, 95 % of ethanol, 0.1 M solutions of HCl and H₂SO₄) exist in thione form. In alkaline medium (0.1 M NaOH) they exist in the form of thiols.

Keywords: ultraviolet spectra, derivatives of 1,2,4-triazole-3-thions, thione-thiol tautomerism, polarity of solvents.

Одинцова Віра Миколаївна. К.фарм.н. (2011), доцент кафедри фармакогнозії, фармакології і ботаніки Запорізького державного медичного університету (2012).

УДК 543.612.3:543.544

Колісник О.В.

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»

ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"»

Розробка методики контролю сенецифіліну та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом ОФ ВЕТШХ

Платифілін являє собою піролізидиновий алкалоїд, що використовується у вигляді 0.2 % ін'єкційного розчину його гідротартратної солі як спазмолітичний засіб. Аналіз нормативної документації, що визначає контроль наявності домішок у субстанції платифіліну гідротартрату, виявив недоліки існуючих (описаних в літературі) методик. Для їх усунення була проведена розробка методики визначення сенецифіліну та інших супровідних домішок у субстанції платифіліну гідротартрату та розчині для ін'єкцій «Платифілін-Здоров'я» методом оберненофазової високоефективної тонкошарової хроматографії. Представлена в роботі хроматографічна система дозволяє відділити домішку сенецифіліну та продукти гідролізу препарату від платифіліну гідротартрату як в субстанції, так і в ін'єкційному препараті за 7 хв та суттєво зменшити об'єми нанесень, що було досягнуто в результаті підбору високочутливих до даних речовин проявних реагентів – парів йоду та спиртового розчину фосфорної кислоти з подальшим нагріванням при 105 °С. У розробленій методиці границі детектування становлять 0.005 мг/мл (0.05 мкг/пляма) для сенецифіліну та 0.01 мг/мл (0.10 мкг/пляма) для платифіліну гідротартрату. Методику апробовано у відділі контролю якості ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"».

Ключові слова: платифіліну гідротартрат, сенецифілін, піролізидинові алкалоїди, оберненофазова високоефективна тонкошарова хроматографія, супровідні домішки.

Платифілін ((1 α ,13S,15Z)-12-гідрокси-1,2-дигідросенеціонан-11,16-діон) – алкалоїд піролізидинової групи, що має виражену спазмолітичну дію та використовується при спазмах гладкої мускулатури органів черевної порожнини, бронхів та кровоносних судин [1]. На фармацевтичному ринку України платифілін у вигляді 0.2 % розчину його гідротартратної солі входить до складу таких ін'єкційних препаратів, як «Платифілін-Здоров'я», «Платифілін-Дарниця» та «Платифілін-Біоф» [2].

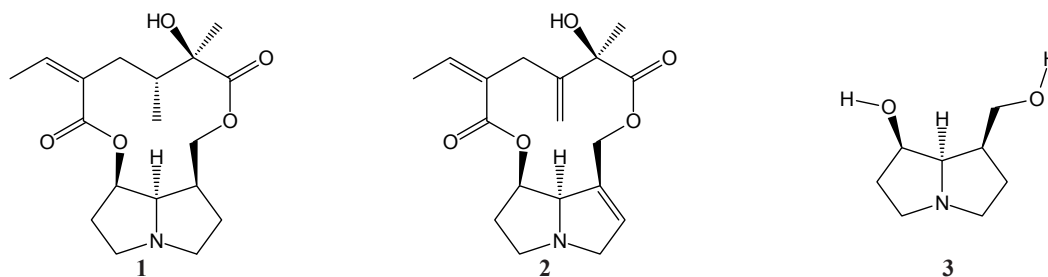
Уперше платифілін був виділений у 1935 р. радянськими вченими Ореховим та Коноваловою з коренів жовтозілля широколистого (рос. – «крестовник широколистный»), що зростає на Закавказзі. При отриманні платифіліну з рослинної сировини головним супутнім алкалоїдом є сенецифілін, що є основною специфічною домішкою у лікарській субстанції платифіліну гідротартрату [3]. За хімічною будовою сенецифілін є подібним до платифіліну, проте, на відміну від останнього, в своїй основі

має ненасичений піролізидиновий цикл (Рис. 1), з чим пов'язують його токсичну дію на організм людини та тварин – нефро- та гепатотоксичну, онкогенну, мутагенну [4, 5]. Тож, у виробництві якісного препарату на основі платифіліну гідротартрату необхідно проводити об'єктивний контроль супровідних домішок як вихідної субстанції, так і готового препарату.

Інформація про субстанцію платифіліну гідротартрату відсутня в Державній Фармакопеї України (ДФУ) та інших сучасних світових фармакопеях [6, 7]. Існуюча нормативна документація на дану субстанцію розроблена на основі [8, 9]. Наприклад, супровідні домішки контролюються за методикою, наведеною у [9], та її частковою модифікацією відносно специфічної домішки сенецифіліну – [10].

Згідно з [8] контроль супровідних домішок субстанції платифіліну гідротартрату включає у себе лише граничний тест на сенецифілін, що ґрунтується на малій розчинності останнього у вигляді основи у воді та менш вираженій осно-

Рисунок 1



Структурні формули платифіліну та його основних супутніх домішок: 1 — платифілін; 2 — сенецифілін; 3 — платинециновий спирт

вності порівняно з вільним платифіліном. В [9] домішки контролювалися методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з внутрішньою нормалізацією. За останніми вимогами контролю якості лікарських засобів, згідно з [11, 12], дані методики є неприйнятними. Так, методика, викладена у [8], не передбачала контролю інших супутніх домішок. Результати ж контролю сенецифіліну за методикою, наведеною в [9], не можна вважати достовірними, оскільки сенецифілін не використовувався в якості стандарту (чого вимагає ДФУ для випробування на вміст особливо токсичних домішок методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27 [11, 12])), а площа його плями на хроматограмі при еквівалентній його кількості та відповідному розведенні проби платифіліну гідротартрату перевищувала пляму останнього в 2-3 рази в залежності від сорбенту. В [10], де сенецифілін наноситься лише для перевірки придатності хроматографічної системи, цього також не враховано, а вміст сенецифіліну все ще порівнюється з розведенням проби платифіліну гідротартрату. До

недоліків методики, згідно з [10], також слід віднести використання для проявлення хроматограми малочутливого модифікованого реагенту Драгендорфа та хлорорганічних розчинників у якості компонентів рухомої фази — хлороформу, метиленхлориду [9, 10] та діетиламіну [13]. Зазначені розчинники є придатними для хроматографічного розділення та ідентифікації цих алкалоїдів в рослинній сировині (вміст домішок не контролюється), але є неприйнятними для застосування в контролі супровідних домішок методом ТШХ, оскільки взаємодіють з платифіліном, що призводить до отримання псевдонегативного результату у вигляді неподілених плям з основною плямою платифіліну. Про взаємодію хлорорганічних розчинників з платифіліном повідомлялося в [14], а стосовно діетиламіну у [15] зазначено, що він деградує під дією кисню повітря і також взаємодіє з платифіліном під час його хроматографування в тонкому шарі сорбенту. Важливим також є те, що платифілін, сенецифілін та продукти гідролізу платифіліну належать до безбарвних речо-

Таблиця 1

Чутливість реагентів проявлення до платифіліну гідротартрату та сенецифіліну в різних хроматографічних системах

Сенецифілін								
Нанесена кількість, мкг/пляму	Реагент для проявлення							
	Модифікований реагент Драгендорфа		Реактив Ерліха (усі маніпуляції згідно з [17])		Пари йоду 20 хв		Пари йоду, обприскування розчином фосфорної кислоти, нагрів. 105 °С	
	1	2	1	2	1	2	1	2
2	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++++
1	слід	+	++	+	++	++	++	+++
0.5	—	слід	+	слід	+	+	+	++
0.25	—	—	слід	—	слід	+	слід	+
0.10	—	—	—	—	—	слід	—	+
0.05	—	—	—	—	—	—	—	слід
Платифілін								
Нанесена кількість, мкг/пляму	Реагент для проявлення							
	Модифікований реагент Драгендорфа		Реактив Ерліха (усі маніпуляції згідно з [17])		Пари йоду 20 хв		Пари йоду, обприскування розчином фосфорної кислоти, нагрів. 105 °С	
	1	2	1	2	1	2	1	2
2	++	++	—	—	+++	+++	слід	+
1	+	+	—	—	++	++	—	слід
0.5	слід	+	—	—	+	+	—	—
0.25	—	слід	—	—	слід	+	—	—
0.10	—	—	—	—	—	+	—	—
0.05	—	—	—	—	—	слід	—	—

Примітки.

1 — пластинка — Merck Kieselgel 60 G, рухома фаза — метанол — аміак 25 % (95:5);

2 — пластинка — Fluka Nano-Silica gel RP-18W, рухома фаза — метанол — аміак 25 % (95:5).

вин, які не поглинають УФ-випромінювання, а це ускладнює їх детектування і змушує в методі ТШХ використовувати реагенти для проявлення.

Отже, метою даної роботи є розробка об'єктивної високочутливої методики контролю сенецифіліну та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом оберненофазової вискоефективної тонкошарової хроматографії (ОФ ВЕТШХ).

Експериментальна частина

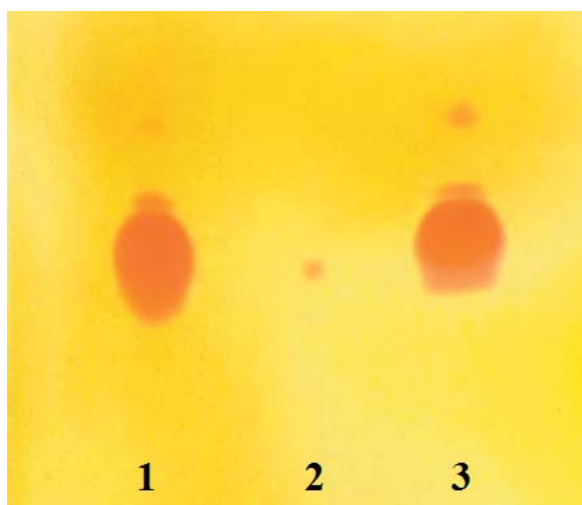
Реагенти та розчини. В роботі були використані платифіліну гідротартрат (Фармакопейний стандартний зразок ДФУ, чистота 99 %), фосфорна кислота (Sigma-Aldrich, чистота 85 %), етанол 96 % (АЛЛХІМ Харків, фарм.), йод (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), метанол (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), розчин аміаку 25 % (Sigma-Aldrich), хлороформ (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), метиленхлорид (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), діетиламін (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), оцтовий ангідрид (Sigma-Aldrich, чистота 99.5 %), перекис водню 30 % (Sigma-Aldrich), п-диметиламінобензальдегід (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), сенецифілін (Fluka, 99.5 %), калію йодид (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), калію гідроксид (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), ацетон (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), діетиловий ефір (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), бензен (Sigma-Aldrich, чистота 99.9 %), петролейний ефір (Sigma-Aldrich), діетиленгліколю моноетиловий ефір (Sigma-Aldrich, чистота 99.5 %), вісмуту нітрат основний (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), оцтова кислота безводна (Sigma-Aldrich, чистота 99.5 %), аскорбінова кислота (Sigma-Aldrich, чистота 99 %), хлористоводнева кислота 36.5 % (Sigma-Aldrich), платиніциновий спирт (Рис. 1, виділений лужним гідролізом основи платифіліну [16], чистота якого перевірялася за температурою плавлення, що наведена в [16], та потенціометричним титруванням розчином 0.1 М HClO_4 у середовищі безводної оцтової кислоти і становить 98.4 %).

Субстанція платифіліну гідротартрату виробництва ВАТFARMA LTD, Грузія, ін'єкційний препарат «Платифілін-Здоров'я» виробництва ТОВ ФК «Здоров'я».

Розчин фосфорної кислоти готували таким чином: у мірну колбу місткістю 50 мл поміщали 30 мл 96 % етанолу та додавали 10 мл 85 % фосфорної кислоти, перемішували, охолоджували та доводили 96 % етанолом до позначки.

Приготування розчину модифікованого реагенту Драгендорфа проводили, як описано далі.

Рисунок 2



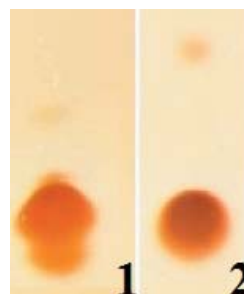
ТШХ-хроматограма субстанції платифіліну гідротартрату згідно з [10]

Примітки.

Пластинка — Merck Kieselgel 60 G, рухома фаза — хлороформ — метанол — аміак 25 % (85:14:1), час хроматографування — 50 хв (10 см), проявлення — модифікований реагент Драгендорфа;

- 1 — платифіліну гідротартрат 250 мкг (10 мкл);
- 2 — платифіліну гідротартрат 2.5 мкг (10 мкл);
- 3 — платифіліну гідротартрат 250 мкг (10 мкл) та сенецифілін 2.5 мкг (10 мкл).

Рисунок 3



ТШХ-хроматограми субстанції платифіліну гідротартрату з використанням різних рухомих фаз

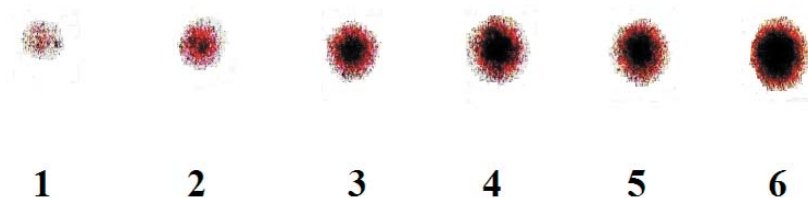
Примітки.

Пластинка — Merck Kieselgel 60 G, нанесена проба — 100 мкг (10 мкл), проявлення — пари йоду;

- 1 — рухома фаза — хлороформ — метанол — аміак 25 % (85:14:1);
- 2 — рухома фаза — метанол — аміак 25 % (95:5).

Розчин 1. До 0.85 г вісмуту нітрату основного додавали 40 мл води, 10 мл безводної оцтової кислоти та збовтували протягом 15 хв. Розчин 2. 8 г калію йодиду розчиняли в 20 мл води. Розчини 1 та 2 змішували (основний розчин). Безпосередньо перед використанням 5 мл основного розчину змішували з 5 мл 1 % водного розчину аскорбінової кислоти та 5 мл 96 % етанолу.

Рисунок 4



Сенецифілін у хроматографічній системі 2 (час хроматографування – 7 хв)

Примітки: 1 – 0.05 мкг; 2 – 0.10 мкг; 3 – 0.15 мкг; 4 – 0.20 мкг; 5 – 0.25 мкг; 6 – 0.30 мкг.

Розчин оцтового ангідриду та реагент Ерліха готували, як описано в [17].

Обладнання. Система для нанесення проб Nanomat 4 (САМАГ, Швейцарія) використовувалась для нанесення проб (5 та 10 мкл в точку) на хроматографічну пластинку. Нанесення виконували на ВЕТШХ-пластинку, висушуючи пробу в струмені теплого повітря.

Розділення проводили на хроматографічних пластинках для ТШХ Merck Kieselgel 60 G (товщина шару сорбенту – 0.25 мм) розміром 20 × 20 см на скляній основі та для ВЕТШХ Fluka Nano-Silica gel RP-18W з флуоресцентним індикатором (кількість органічного модифікатора, привитого до поверхні, у перерахунку на вуглець, становить 14 %; товщина шару сорбенту – 0.15 мм) розміром 20 × 20 см на алюмінієвій основі. Хроматографування проводили в прямокутній камері з попереднім насичення хроматографічної камери рухомою фазою згідно з [11, 12].

Дериватизація (проявлення): в йодній камері, за допомогою ручного розпилювача (САМАГ, Швейцарія), що дозволяє отримувати тонкодисперсний струмінь реагенту-проявника. Отримані ТШХ-хроматограми фіксували за допомогою сканера WIA Canon MF4100 Series, використовуючи як звичайний кольоровий режим, так і спеціальний режим мінімальної яскравості (-127) та максимального контрасту (127), що дозволяє фіксувати ВЕТШХ-хроматограму з флуоресцентним індикатором (біла флуоресценція) після її послідовного проявлення (пари йоду – розчин фосфорної кислоти – нагрів 105 °С).

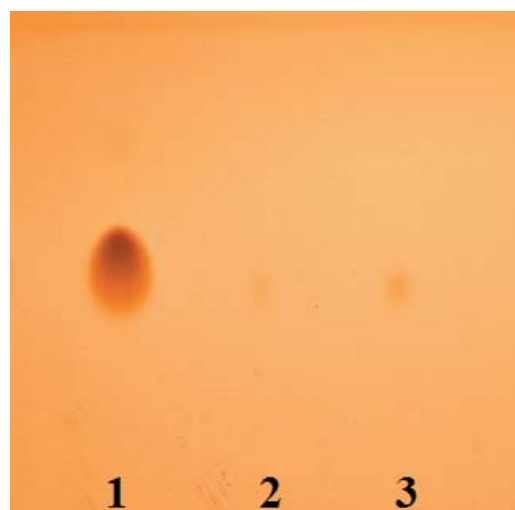
Приготування розчинів. Стандартні розчини платифіліну гідротартрату з концентрацією 25 та 2 мг/мл отримували розчиненням точних наважок платифіліну гідротартрату у дистильованій воді. Термін придатності розчинів при зберіганні в темному прохолодному місці –

14 днів. Робочі розчини готували розведенням стандартних розчинів дистильованою водою до отримання необхідної концентрації. Розчини використовували свіжоприготованими.

Стандартний розчин сенецифіліну з концентрацією 0.5 мг/мл отримували розчиненням точної наважки сенецифіліну у 0.01 М розчині хлористоводневої кислоти. Термін придатності розчину при зберіганні в темному прохолодному місці – 7 днів. Приготування робочих розчинів здійснювали розведенням стандартного розчину 0.01 М розчином хлористоводневої кислоти до отримання необхідної концентрації. Розчини використовували свіжоприготованими.

Стандартний розчин платинецинового спирту з концентрацією 2 мг/мл готували розчинен-

Рисунок 5



Платифілін у хроматографічній системі 2 (час хроматографування – 7 хв)

Примітки.

1 — субстанція платифіліну гідротартрату (20 мкг); 2, 3 — розведення проби платифіліну (0.10 та 0.20 мкг відповідно).

ням точної наважки платинецинового спирту в дистильованій воді. Термін придатності розчину при зберіганні в темному прохолодному місці — 7 днів. Робочі розчини одержували розведенням стандартного розчину дистильованою водою до отримання необхідної концентрації. Розчини використовували свіжоприготованими.

Модельна суміш препарату була виготовлена у виробничих умовах згідно з регламентом на приготування ін'єкційного препарату «Платифілін-Здоров'я» [18]. Розчин вилучали з ампул та використовували свіжоприготованим.

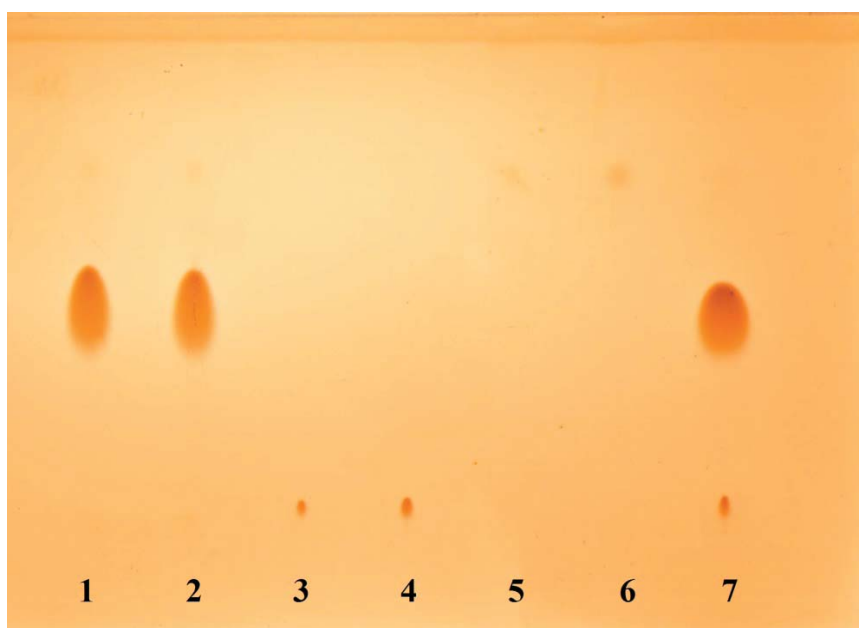
Результати та їх обговорення

Вибір і оптимізація складу рухомої фази, умов хроматографування та пробопідготовки

Методики контролю супровідних домішок методом ТШХ у субстанції платифіліну гідротартрату [9, 10] є неприйнятними, оскільки мають ряд суттєвих недоліків, на які вказано вище. У свою чергу підхід до розробки методик контролю якості готових лікарських засобів, який часто застосовують вітчизняні виробники ліків — перенесення методик контролю якості

субстанцій на лікарські засоби, для ін'єкційного розчину платифіліну гідротартрату також автоматично стає неприйнятним. Причому такими методиками продовжують користуватися й нині. Ін'єкційні препарати платифіліну у своєму складі містять лише діючу речовину та воду для ін'єкцій. На перший погляд здається, що тут немає ніяких перепон для переносу методики контролю домішок з субстанції на готову лікарську форму, але є певні правила ТШХ. Препарат з концентрацією 2 мг/мл є надто розведеним, і для того щоб контролювати в ньому 1.0 % сенецифіліну та 1.0 % інших супутніх домішок з використанням малочутливого модифікованого реагенту Драгендорфа (Табл. 1), потрібно наносити в одну точку на ТШХ-пластинку понад 100 мкл розчину препарату. Згідно з технікою нанесення проб на пластинку в нормальнофазовій ТШХ [15], яку використовують в [9, 10], рекомендовано, щоб розчинник був доволі легким, а вода й зовсім не рекомендується, так як досить довго видаляється з шару сорбенту. Тож при нанесенні таких розчинів і в таких кількостях неможливо отримати компактну пляму без «хвоста» [15].

Рисунок 6



Контроль домішки платинецину в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному розчині «Платифілін-Здоров'я»

Примітки.

Хроматографічна система 2, час хроматографування — 7 хв, проявлення парами йоду;

1 — субстанція платифіліну гідротартрату (20 мкг);

2 — ін'єкційний розчин «Платифілін-Здоров'я» (20 мкг);

3, 4 — точки розведення платинецину (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

5, 6 — розведення сенецифіліну (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

7 — придатність хроматографічної системи (платинецин (0.10 мкг), платифіліну гідротартрат (20 мкг) та сенецифілін (0.20 мкг) в порядку збільшення R_f).

На Рис. 2 наведено хроматограму, отриману для субстанції платифіліну гідротартрату згідно з [10]. Як можна бачити з представленої хроматограми, хроматографічні плями платифіліну за формою є далекими від ідеальних. При цьому здається, що присутня додаткова, невідділена домішка над основною плямою платифіліну. Ця додаткова пляма є продуктом взаємодії хлороформу та платифіліну. Заміна ж рухомої фази на іншу, в якій проходить чітке розділення платифіліну та сенецифіліну (метанол – аміак 25 % (95:5)), не призводить до такого результату, що видно з Рис. 3.

Було вирішено замінити нормальнофазову ТШХ на оберненофазову ВЕТШХ, в якій, навпаки, в якості розчинників для проб використовують полярні розчинники, зокрема воду, що підходить для роботи з водним ін'єкційним препаратом платифіліну гідротартрату з концентрацією 0.2 %. Рухома фаза метанол – аміак 25 % (95:5) оптимально підійшла для даного сорбенту. Вибір даної рухомої фази забезпечив

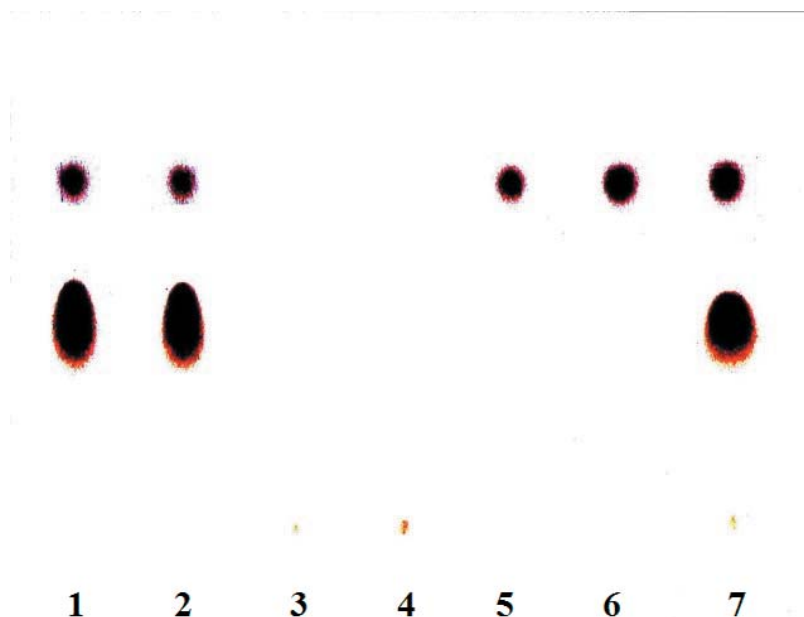
добру роздільну здатність платифіліну та сенецифіліну, високу чутливість визначення цих сполук, а також відтворюваність їх R_f (0.70 для сенецифіліну та 0.48 для платифіліну).

Виявлена чутливість на платифілін та сенецифілін підхожих реагентів для проявлення піролізидинових алкалоїдів у різних хроматографічних системах представлена в Табл. 1.

Виходячи з наведених даних найчутливішою до сенецифіліну є хроматографічна система 2 з проявленням парами йоду (20 хв) та подальшим обприскуванням розчином фосфорної кислоти і нагріванням при 105 °С (10 хв) при використанні запропонованого способу обробки хроматограми сканером для документування та чіткішого розпізнавання плям (процедура описана в розділі «Обладнання») (Рис. 4). До платифіліну також найчутливішою є хроматографічна система 2 з проявленням парами йоду (Рис. 5).

Отже, оптимальними умовами для визначення супровідних домішок у субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному розчи-

Рисунок 7



Контроль домішки платинецину в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному розчині «Платифілін-Здоров'я»

Примітки.

Хроматографічна система 2, час хроматографування – 7 хв, проявлення – пари йоду, розчин фосфорної кислоти, нагрівання – 105 °С протягом 10 хв;

1 – субстанція платифіліну гідротартрату (20 мкг);

2 – ін'єкційний розчин «Платифілін-Здоров'я» (20 мкг);

3, 4 – точки розведення платинецину (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

5, 6 – розведення сенецифіліну (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

7 – придатність хроматографічної системи (платинецин (0.10 мкг), платифіліну гідротартрат (20 мкг) та сенецифілін (0.20 мкг) в порядку збільшення R_f).

ні «Платифілін-Здоров'я» (окрім сенецифіліну) є використання хроматографічної системи 2 з проявленням парами йоду та подальшою обробкою розчином фосфорної кислоти і нагріванням при 105 °С. Для перевірки стійкості субстанції та препарату при використанні хроматографічної системи 2 разом із платифіліном та сенецифіліном хроматографували платинециновий спирт, що залишався на старті та ані в субстанції, ані в препараті не був виявлений (Рис. 6, 7).

Результати контрольних визначень домішок в субстанції та препараті представлені на Рис. 8, 9, кожне нанесення проби — 10 мкл.

Висновки

1) Аналіз нормативної документації, що визначає контроль наявності домішок в субстанції платифіліну гідротартрату, показав недоліки існуючих (описаних в літературі) методик.

2) Проведені дослідження з оптимізації методик ТШХ дозволили розробити високочутливу методику визначення сенецифіліну та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та розчині для ін'єкцій «Платифілін-Здоров'я» методом оберненофа-

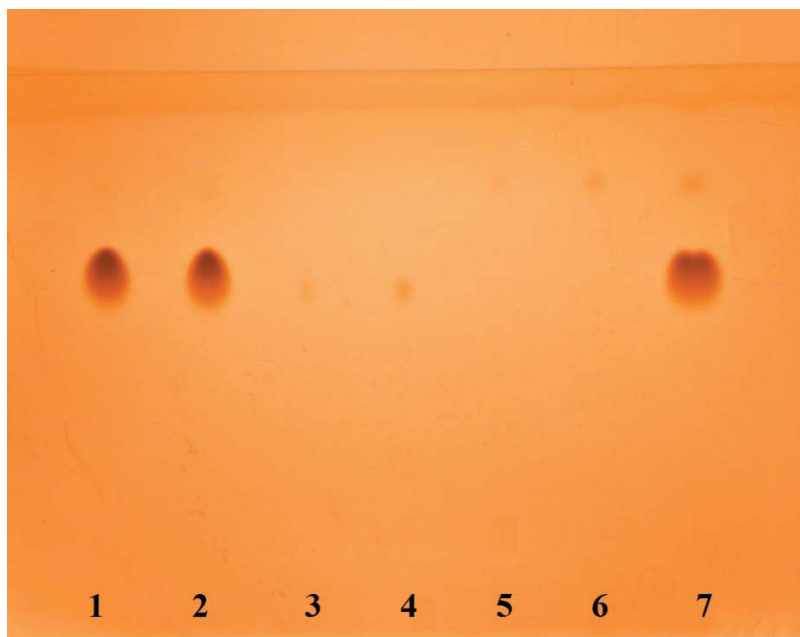
зової високоефективної тонкошарової хроматографії.

3) Використання в якості рухомої фази суміші розчинників метанол — 25 % водний розчин аміаку в об'ємному співвідношенні 95:5, а в якості нерухомої фази Nano-Silica gel RP-18W з флуоресцентним індикатором, що дає білу флуоресценцію, дозволило за 7 хв відділити домішку сенецифіліну від платифіліну гідротартрату та суттєво зменшити об'єм проб, що наносяться на пластинку.

4) Дериватизація з використанням парів йоду дозволяє чітко ідентифікувати платифіліну гідротартрат та мінімальні концентрації розведення стандартного зразка платифіліну гідротартрату. Межа детектування (використання методу внутрішньої нормалізації для визначення неідентифікованих домішок) становить 0.10 мкг/пляма, а для сенецифіліну з подальшою обробкою розчином фосфорної кислоти та нагріванням при 105 °С (10 хв) — 0.05 мкг/пляма.

5) Розроблену методику апробовано у відділі контролю якості ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"».

Рисунок 8



Контроль домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному розчині «Платифілін-Здоров'я»

Примітки.

Хроматографічна система 2, час хроматографування — 7 хв, проявлення парами йоду;

1 — субстанція платифіліну гідротартрату (20 мкг);

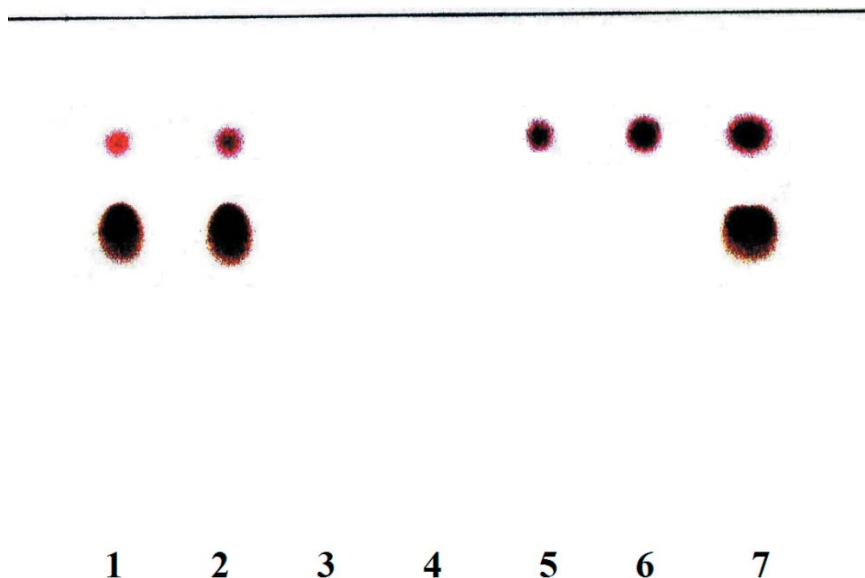
2 — ін'єкційний розчин «Платифілін-Здоров'я» (20 мкг);

3, 4 — розведення платифіліну гідротартрату (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

5, 6 — розведення сенецифіліну (0.10 та 0.20 мкг відповідно),

7 — придатність хроматографічної системи (платифіліну гідротартрат (20 мкг) та сенецифілін (0.20 мкг) в порядку збільшення R_f).

Рисунок 9



Контроль домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному розчині «Платифілін-Здоров'я»

Примітки.

Хроматографічна система 2, час хроматографування — 7 хв, проявлення — пари йоду, розчин фосфорної кислоти, нагрівання — 105 °С (10 хв);

1 — субстанція платифіліну гідротартрату (20 мкг);

2 — ін'єкційний розчин «Платифілін-Здоров'я» (20 мкг);

3, 4 — розведення платифіліну гідротартрату (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

5, 6 — розведення сенецифіліну (0.10 та 0.20 мкг відповідно);

7 — придатність хроматографічної системи (платифіліну гідротартрат (20 мкг) та сенецифілін (0.20 мкг) в порядку збільшення R_f).

Подяки

Автор висловлює щире подяку науковому керівникові чл.-кор. НАН України, д.фарм.н., професору Георгієвському В.П. за підтримку даної роботи та ряд цінних зауважень, а також керівництву ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"» та особисто директору з якості та сертифікації Броніній О.А. за надання матеріальної та технічної бази для виконання експериментальної частини роботи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — [16-е изд., перераб., испр. и доп.]. — Москва: Новая волна, 2012.
2. Державний реєстр лікарських засобів України. — Режим доступу: <http://www.drlez.kiev.ua>.
3. Исследование и оптимизация процесса твердофазной экстракции платифиллина из крестовника / Ларионов Н.Г., Ахназарова С.А., Кочерга С.И. // Хим.-фарм. журн. — 1981. — № 15 (3) — С. 66-70.
4. Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in *Drosophila* and their transfer into rat milk / Candrian U., Lithy J., Graf U., Schlatter C.H. // Food Chem. Toxicol. — 1984. — № 22. — P. 223-225.
5. Pyrrolizidine alkaloids -genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms / Fu P.P., Xia Q., Lin

G., Chou M.W. // Drug Metab. Rev. — 2004. — № 36 (1). — P. 1-55.

6. European Pharmacopoeia. 8th Edition. — European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). — Council of Europe, 67075, Strasbourg Cedex, France, 2013. — 3655 p.

7. The United States Pharmacopoeia. 32nd Edn. — The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville Md, 2014. — 5171 p.

8. Государственная фармакопея СССР. — [10-е изд.]. — Москва: Медицина, 1968. — 1079 с.

9. ФС 42У-7-1175-01 «Платифіліну гідротартрат».

10. АНД-ДВ-ДР-023 «Платифиллина гідротартрат».

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

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

13. Dauksha V.E. Chromatographic monitoring of the completeness of the isolation of alkaloids from *Senecio platyphylloides* / Chemistry of Natural Compounds. — 1970. — № 6 (2). — P. 273.

14. Устойчивость платифиллина и динамика взаимодействия его с различными средами / Ларионов Н.Г., Кочерга С.И., Кривут Б.А. // Хим.-фарм. журн. — 1985. — № 19 (5). — С. 612-614.

15. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 т. / Под

ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2011.

16. Орехов А.П. Химия алкалоидов растений СССР. — Москва: Наука, 1965.

17. Mattocks A.R. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms / Journal of Chromatography A. — 1967. — № 27. — P. 505-508.

18. Технологический регламент ТР 64-31437750-018-2014 «Платифиллин-Здоровье, раствор для инъекций 2 мг/мл по 1 мл в ампулах № 10 (5 x 2) в блистерах в коробке; № 10 (10 x 1) в коробке».

УДК 543.612.3 : 543.544

Резюме

Колисник А.В.

Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»

ООО «Фармацевтическая компания "Здоровье"», Харьков

Разработка методики контроля сенецифиллина и других сопутствующих примесей в субстанции платифиллина гидротартрата и инъекционном препарате «Платифиллин-Здоровье» методом ОФ ВЭТСХ

Платифиллин представляет собой пирролизидиновый алкалоид, который используется в виде 0.2 % инъекционного раствора его гидротартратной соли как спазмолитическое средство. Анализ нормативной документации, определяющей контроль наличия примесей в субстанции платифиллина гидротартрата, обнаружил недостатки существующих (описанных в литературе) методик. Для их устранения была проведена разработка методики определения сенецифиллина и других сопутствующих примесей в субстанции платифиллина гидротартрата и растворе для инъекций «Платифиллин-Здоровье» методом обращенно-фазовой высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Представленная в работе хроматографическая система позволяет отделить примеси сенецифиллина и продукты гидролиза препарата от платифиллина гидротартрата как в субстанции, так и в инъекционном препарате за 7 мин и существенно уменьшить объемы нанесений, что было достигнуто в результате подбора высокочувствительных к данным веществам проявляющих реагентов — паров йода и спиртового раствора фосфорной кислоты с последующим нагреванием при 105 °С. В разработанной методике границы детектирования составили 0.005 мг/мл (0.05 мкг/пятно) для сенецифиллина и 0.01 мг/мл (0.10 мкг/пятно) для платифиллина гидротартрата. Методика апробирована в отделе контроля качества ООО «Фармацевтическая компания "Здоровье"».

Ключевые слова: платифиллина гидротартрат, сенецифиллин, пирролизидиновые алкалоиды, обращенно-фазовая высокоэффективная тонкослойная хроматография, сопутствующие примеси.

UDC 543.612.3 : 543.544

Summary

Kolisnyk O.V.

National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute», Ukraine

Pharmaceutical Company «Zdorovie» Ltd, Kharkiv, Ukraine

Development of control procedure for seneciphylline and other related impurities in platyphylline hydrotartrate substance and «Platyphylline-Zdorovie» injectable preparation by using RP HPTLC method

Platyphylline is a pyrrolizidine alkaloid, which is used in the form of 0.2 % injectable solution of its hydrotartrate salt as antispasmodic. Analysis of normative documentation, defining the control of impurity presence in platyphylline hydrotartrate substance, has revealed the gaps of existing (described in the literature) methods. To solve them the development of procedure for determination of seneciphylline and its impurities in platyphylline hydrotartrate active substance and «Platyphylline-Zdorovie» solution for injection by using reversed-phase high-performance thin layer chromatography has been carried out. Chromatographic system presented in the work enables to separate seneciphylline impurity and drug hydrolysis products from platyphylline hydrotartrate both in the substance and injectable preparation within 7 minutes and significantly reduce application volumes, which has been achieved in the result of selection of high-sensitive to these substances revealing reagents — iodine vapour and phosphoric acid alcohol solution with further heating at 105 °C. In the developed procedure limits of detection were 0.005 mg/ml (0.05 µg/spot) for seneciphylline and 0.01 mg/ml (0.10 µg/spot) for platyphylline hydrotartrate. The procedure has been approbated in the quality control division of Pharmaceutical Company «Zdorovie» Ltd.

Keywords: platyphylline hydrotartrate, seneciphylline, pyrrolizidine alkaloids, reversed-phase high-performance thin layer chromatography, related impurities.

Колісник Олексій Васильович (нар. 1990). Закінчив Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна (2012). Провідний хімік ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"». Аспірант кафедри біотехнології, біофізики і аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (2015).

Фармакологічні дослідження

УДК 547.831.8:615.214.32+616.831-001:57.084.1

Подольський І.М., Штриголь С.Ю., Лар'яновська Ю.Б.
Національний фармацевтичний університет

Експериментальне дослідження церебропротекторного впливу 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону на морфологічні порушення у структурах головного мозку щурів після черепно-мозкової травми

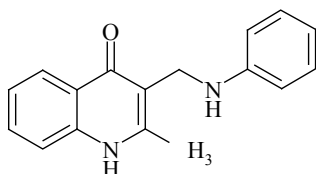
У роботі наведено результати морфологічного дослідження церебропротекторного впливу 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону (атристаміну) в дозі 100 мг/кг на порушення у структурах головного мозку щурів в умовах експериментальної черепно-мозкової травми (ЧМТ). Досліджено сенсомоторну кору великих півкуль головного мозку, кору мозочка, судинні сплетіння у мозкових шлуночках щурів (бокових та четвертому). Проведено морфометричний аналіз впливу досліджуваної сполуки та референс-препарату пірацетаму на розвиток морфологічних ознак модельної патології. Показано, що за ступенем вираженості церебропротекторного впливу на морфологічний стан досліджених ділянок головного мозку щурів після ЧМТ атристамін (100 мг/кг) переважає препарат порівняння пірацетам (400 мг/кг), що повністю співвідноситься з результатами попередніх досліджень нейропротекторних властивостей атристаміну із застосуванням поведінкових тестів.

Ключові слова: 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-он, черепно-мозкова травма, нейропротекторна активність, морфологічне дослідження.

Травматичні ушкодження черепа та головного мозку становлять 30-40 % усіх травм і посідають перше місце за показниками летальності та інвалідизації серед осіб працездатного віку. За даними ВООЗ кожного року понад 10 млн осіб у світі отримують черепно-мозкову травму (ЧМТ), а в різних регіонах України цей показник щорічно становить від 2.3 до 6.0 випадків (в середньому 4.0-4.2) на 1000 мешканців [1]. При цьому кількість хворих з ЧМТ з року в рік зростає, що актуалізує пошук нових та більш ефективних препаратів для полегшення наслідків перенесеної патології.

Відомо, що одними з найбільш поширених і соціально значущих віддалених наслідків перенесеної ЧМТ є депресивні розлади [2], які є наслідком впливу як прямих біологічних факторів, так і психологічних та соціальних чинників [3]. Отже, актуальним залишається питання пошуку нових безпечних лікарських засобів, які можливо застосовувати при лікуванні з перших годин після ЧМТ як з метою нейропротекції, так і для профілактики можливих депресивних розладів.

Рисунок 1



Структурна формула атристаміну (2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону)

Об'єктом даного дослідження є 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-он (Рис. 1), який вивчається під умовною назвою «атристамін» як перспективний антидепресант з ноотропними властивостями [4].

У попередніх дослідженнях була доведена висока антидепресивна активність атристаміну [4, 5]. Крім того, досліджено спектр додаткових нейрофармакологічних властивостей зазначеної молекули (антиамнестична, антигіпоксична) [6, 7], вплив на обмін церебральних моноамінів у головному мозку мишей [8]. Результати власних досліджень і виступили підґрунтям для вивчення нейропротекторних властивостей атристаміну, які були доведені за допомогою поведінкових методик після перенесеної ЧМТ [9].

Отже, метою даного дослідження є морфологічне вивчення церебропротекторного впливу атристаміну на порушення у структурах головного мозку щурів, спричинені перенесеною ЧМТ.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження було проведено на базі ЦНДЛ НФаУ на 20 рандомбредних білих щурах-самках масою 200-240 г із дотриманням біоетичних вимог відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які застосовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Протокол морфологічного дослідження було повністю гармонізовано із попереднім протоколом, у якому вивчалась нейропротекторна дія атристаміну після ЧМТ із застосуванням поведінкових тестів [9].

ЧМТ відтворювали шляхом нанесення механічної травми вантажем масою 50 г на тим'яно-потиличну ділянку склепіння черепа наркотизованих ефіром щурів. Вантаж опускали з висоти 60 см. Енергія удару дорівнювала 0.294 Дж [10].

Лабораторних тварин було рандомізовано на 4 експериментальні групи:

- 1) інтактна група (n = 5) — тварин наркотизували без відтворення ЧМТ;
- 2) група контрольної патології (n = 5) — тварин наркотизували та відтворювали ЧМТ без подальшого лікування;
- 3) група атристаміну (n = 5) — тварин піддавали лікуванню атристаміном у дозі 100 мг/кг;
- 4) група пірацетаму (n = 5) — тварин піддавали лікуванню пірацетамом у дозі 400 мг/кг.

Пірацетам обрано для порівняння на підставі того, що його рекомендовано чинним протоколом лікування ЧМТ [11], а доза знаходиться в діапазоні терапевтичних в експериментальній нейрофармакології [12, 13].

Атристамін та пірацетам вводились тваринам внутрішньошлунково за допомогою спеціального зонда (атристамін — у вигляді стабільної тонкої водної суспензії, пірацетам — у вигляді водного розчину) за 30 хв до індукції ЧМТ та раз на добу протягом наступних двох днів. Останнє введення — за 30 хв до вилучення мозку. Тварини з інтактною групою та групи контрольної патології отримували еквівалентний об'єм ізотонічного розчину за аналогічною схемою.

Головний мозок вилучали у наркотизованих щурів (тіопентал-натрій, 60 мг/кг, внутрішньоочеревинно) та цілком фіксували у 96 % етанолі, потім робили фронтальні розрізи на рівні передніх країв скроневих часток та кори мозочка. Зразки заливали у целоїдин-парафін, різали на санному мікромомі. Зрізи товщиною 4-5 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином [14].

Досліджували сенсомоторну кору (СМК) великих півкуль головного мозку, кору мозочка, судинні сплетіння у бокових (СМК) та у четвертому (мозочок) мозкових шлуночках щурів. На мікропрепаратах, окрім якісної оцінки стану тканин мозку, проводили морфометричні вимірювання. Підраховували загальну кількість нормальних пірамідних нейронів, визначали гліонейрональний індекс (відношення числа гліонейрональних елементів до пірамідних нейронів — 3-й та 5-й шар), перинейрональний сателітний індекс (кількість клітин сателітної глії на 1 нейрон) [15]. Усі вимірювання виконували під мікроскопом (окуляр — 10, об'єктив — 40) у 5 повтореннях.

Перегляд мікропрепаратів проводили під світловим мікроскопом Granum, мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum DCM 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2.4 GHz за допомогою програми Tour View.

Результати та обговорення

1. Сенсомоторна кора великих півкуль головного мозку

У тварин інтактного контролю судини м'якої мозкової оболонки звичайного вигляду, повнокровність у межах норми. Пошарова будова кори не змінена. Чіткість та вертикальне упорядкування шарів нейронів збережені. Клітини у шарах варіювалися за розміром, формою, об'ємом нейроплазми, щільністю розташування. У переважній більшості пірамідних нейронів клітинне тіло мало достатньо чіткий, рівний контур, нейроплазма без ознак вакуолізації. Ядро нейронів округле, переважно центрально розташоване, хроматин неконденсованого типу. Ядерце одне, локалізоване у центрі ядра. Нейрогліальні клітини помірні за кількістю. Диференціювання клітин глії не проводили. Клітини глії розташовані як самотійно — поодинокі, або у вигляді дрібних скупчень (не більше 2-3 клітин), так і перинейронально — сателіти. Нейропіль мав безструктурний вигляд. Капіляри, що пронизують тканину мозку, помірно повнокровні, з добрим тургором, перикапілярні простори незначні (Рис. 2а).

На третій день посттравматичного періоду в щурів групи контрольної патології спостерігались різні за розміром зони виразної застійної повнокровності судин м'якої мозкової оболонки СМК великих півкуль (Рис. 2б). Місцями цілісність судинної стінки порушена. Еритроцити видні на поверхні оболонки (субарахноїдальні крововиливи) або мали місце підоболонкові крововиливи. Виявлялися й одиничні доволі масивні так звані контузійні осередки. На цих ділянках тканина геморагічно просякнена, відмічали агрегацію еритроцитів та гемоліз, будова її порушена, нервові клітини загиблі.

На незруйнованих ділянках СМК великих півкуль тонкостінні кровоносні судини частково спазмовані, частково застійно повнокровні. Спостерігається перикапілярний, перивазальний, місцями перицелюлярний набряк (Рис. 2б).

Також виявлено окремі дрібні фокуси порушення упорядкованого розташування нейронів (Рис. 3а), які втрачали характерні властивості, знаходились на різних стадіях некрозу та не-

кробіозу. Самі фокуси оточені проліфератами клітин глії. Крім того, спостерігались окремі дрібновогнищеві гліальні скупчення. Помічено збільшення сателітозу (Рис. 3б).

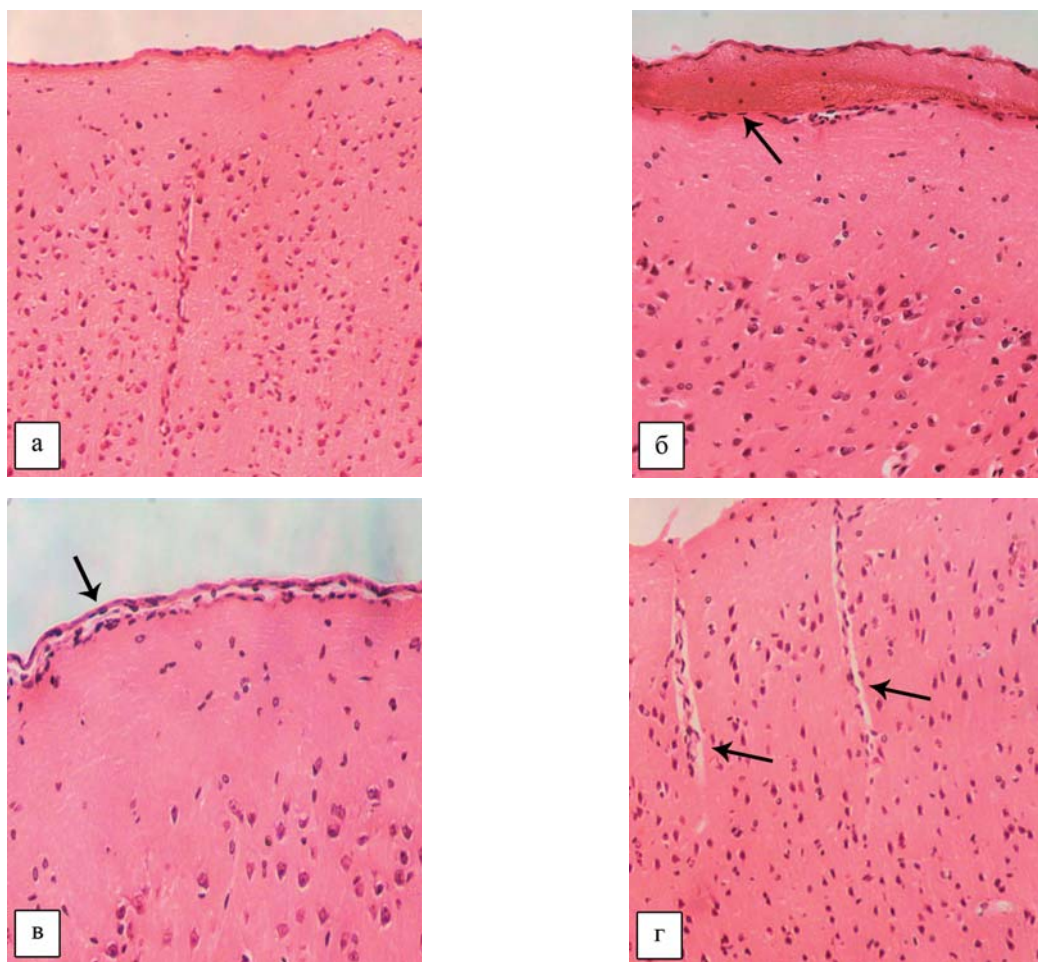
У групи тварин, яких піддавали лікуванню атристаміном, повнокровність кровоносних судин м'якої мозкової оболонки переважно нормальна, судинна стінка неущождена (Рис. 2в). Лише на окремих ділянках спостерігалась застійна повнокровність судин, мікророзриви судинної стінки і незначна кількість еритроцитів на поверхні судини. Крововиливи у мозок у переважній більшості щурів відсутні. Значно менш вираженим був спазм тонкостінних кровоносних судин, перикапілярний та перивазальний

набряк. Відсутні вогнищеві гліальні реакції, фокуси порушення гістоструктури мозку.

Після лікування пірацетамом спостерігалась доволі значна варіабельність стану кровоносних судин м'якої мозкової оболонки СМК великих півкуль у різних тварин групи: як нормальний стан судин, так і застійна повнокровність. Мали місце крововиливи при ушкодженні судинної стінки. Крововиливи у тканину мозку відсутні. Лише в одному випадку виявлено дрібні фокуси порушення гістоструктури мозку у глибині СМК великої півкулі зі значним розрідженням нейронів і нейропіля.

У деяких тварин зберігався різний за виразністю спазм тонкостінних судин, перикапіляр-

Рисунок 2



СМК великих півкуль тварин:

- а — інтактної групи (незмінена цитоархітектоніка шарів, щільність нейропіля, $\times 100$);
 б — групи контрольної патології — ЧМТ (\uparrow — застійна повнокровність судин м'якої мозкової оболонки, $\times 200$);
 в — групи атристаміну (\uparrow — нормальний стан судин м'якої мозкової оболонки, $\times 250$);
 г — групи пірацетаму (\uparrow — спазм капілярів, помірний перикапілярний набряк, $\times 250$).
 Забарвлення — гематоксилін та еозин.

ний та перицелюлярний набряк (Рис. 2г). Помітна гліальна реакція не спостерігалась.

2. Морфометричний аналіз

Результати морфометричних вимірювань дозволили встановити певні кількісні міжгрупові відмінності.

У тварин інтактної групи середня чисельність нормальних пірамідних нейронів на стандартній морфометричній сітці становила 80.2 клітини (Табл. 1). Гліонейрональний та перинейрональний індекси відповідали нормі для щурів [16] і дорівнювали 0.619 та 1.28 відповідно (Табл. 1).

У неліквованих тварин морфометричний аналіз виявив достовірне зменшення середньої кількості нормальних пірамідних нейронів у полі зору мікроскопа (на 15.08 %), збільшення гліонейронального індексу на 24.7 % та збільшення перинейронального сателітного індексу у цих щурів у 1.68 рази порівняно з інтактним контролем (Табл. 1). Ці показники відображають доволі високий рівень метаболічної напруги нейронів, при якій виникає втрата їх пластичних та біоенергетичних запасів. Поповнення останніх здійснюється саме за рахунок та крізь контакти з гліальними клітинами-сателітами [17].

У препаратах головного мозку тварин, яким вводили атристамін в якості лікувального агента, чисельність нормальних пірамідних нейронів у полі зору мікроскопа та гліонейрональний індекс хоча і не досягли рівня інтактних

тварин (Табл. 1), але порівняно з контрольною патологією достовірно змінились (на + 10.13 % та - 7.25 % відповідно). Перинейрональний сателітний індекс відновився майже до рівня інтактного контролю.

Результати морфометричного аналізу у групі тварин, яким вводили пірацетам, підтверджують позитивний вплив даного лікарського засобу на відновлювальні процеси у головному мозку після перенесеної ЧМТ. Чисельність нормальних пірамідних нейронів у полі зору мікроскопа, гліонейрональний та перинейрональний індекси хоча і не сягали рівня інтактного контролю (Табл. 1), але достовірно змінились порівняно з контрольною патологією.

3. Кора мозочка

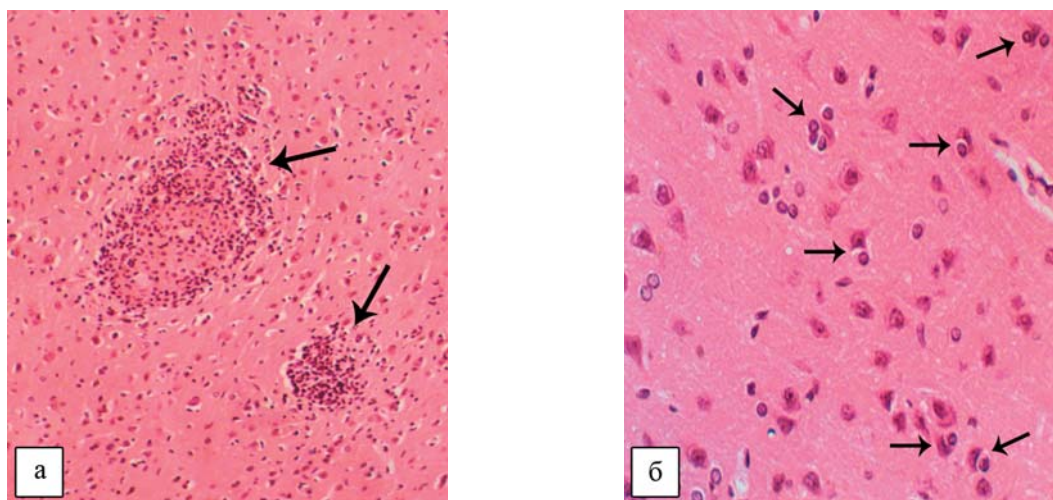
Загальний стан кори мозочка тварин та зміни під впливом перенесеної ЧМТ співвідносяться зі станом СМК великих півкуль головного мозку (Рис. 4).

На третій день посттравматичного періоду в щурів групи контрольної патології спостерігали різні за розміром зони виразної застійної повнокровності судин м'якої мозкової оболонки кори мозочка.

Місцями цілісність судинної стінки була порушена та мали місце підоболонкові крововиливи (Рис. 4б), які в поодиноких випадках поширювались вглиб речовини мозку.

У переважної більшості тварин групи атристаміну відсутні крововиливи у мозок, лише у од-

Рисунок 3



СМК великих півкуль головного мозку тварин групи контрольної патології (ЧМТ):

а — фокуси порушення упорядкованого розташування нейронів, оточені проліфератами клітин глії, ↑ (×200);

б — збільшення сателітозу, ↑ (×250).

Забарвлення — гематоксилін та еозин.

Таблиця 1

Вплив атристаміну та пірацетаму на кількісні показники морфологічного стану пірамідних нейронів СМК великих півкуль головного мозку щурів в умовах ЧМТ

Група	Показники		
	Гліонейрональний індекс	Перинейрональний сателітний індекс	Чисельність нормальних пірамідних нейронів
Інтактний контроль	0.619 ± 0.009	1.28 ± 0.08	80.2 ± 1.8
ЧМТ (контрольна патологія)	0.772 ± 0.019*	2.16 ± 0.12*	68.10 ± 0.7*
ЧМТ + атристамін, 100 мг/кг	0.716 ± 0.012*/#	1.48 ± 0.10 ^{#/§}	75.0 ± 1.0*/#
ЧМТ + пірацетам, 400 мг/кг	0.721 ± 0.013*/#	1.76 ± 0.07*/#	72.3 ± 1.6*/#

Примітки.

* — $p \leq 0.05$ відносно групи інтактного контролю (критерій Манна-Вітні);

— $p \leq 0.05$ відносно групи контрольної патології (критерій Манна-Вітні);

§ — $p \leq 0.05$ відносно групи, що отримувала пірацетам (критерій Манна-Вітні).

нієї тварини спостерігали одиничний невеликий підоболонковий крововилив у корі мозочка.

У тварин, що отримували пірацетам, спостерігалась значна варіабельність стану кровоносних судин м'якої мозкової оболонки кори мозочка, мали місце поодинокі субарахноїдальні крововиливи при порушенні цілісності судинної стінки, але поширення їх у тканину мозку не зафіксовано.

4. Мозкові шлуночки та судинні сплетіння

Судинні сплетіння головного мозку являють собою багаті на капіляри структури, які у вигляді відростків виступають у просвіт шлуночків. Їх утворюють випини м'якої мозкової оболонки. Основною функцією судинних сплетінь є синтез спинномозкової рідини.

В інтактних щурів епітелій, що вкриває вільну поверхню судинного сплетіння (спеціалізовані клітини епендими), кубічний та одношаровий (Рис. 5а). Строма подана тонким шаром сполучної тканини. Під епітелієм розташовані численні, помірно розширені й повнокровні звивисті капіляри, які створюють у цьому епітелії бугорки — ворсинки. Епітеліальна вистілка стінки шлуночків також подана нормального виду шаром кубічних клітин, строма не змінена.

На третю добу після відтворення ЧМТ у тварин групи контрольної патології у стінках мозкових шлуночків (і бокових, і четвертого) спостерігали ділянки розриву епітеліального пласта з втратою однорядного розташування клітин, набряк строми, просякнення її фібрином (Рис. 5б). У відростках судинного сплетіння також спостерігали набряк строми з просякненням фібрином, розриву епітелію, звивисті капіляри часто різко розширені, суцільно заповнені еозинофільною рідиною із домішкою еритроцитів. Іноді крововилив від-

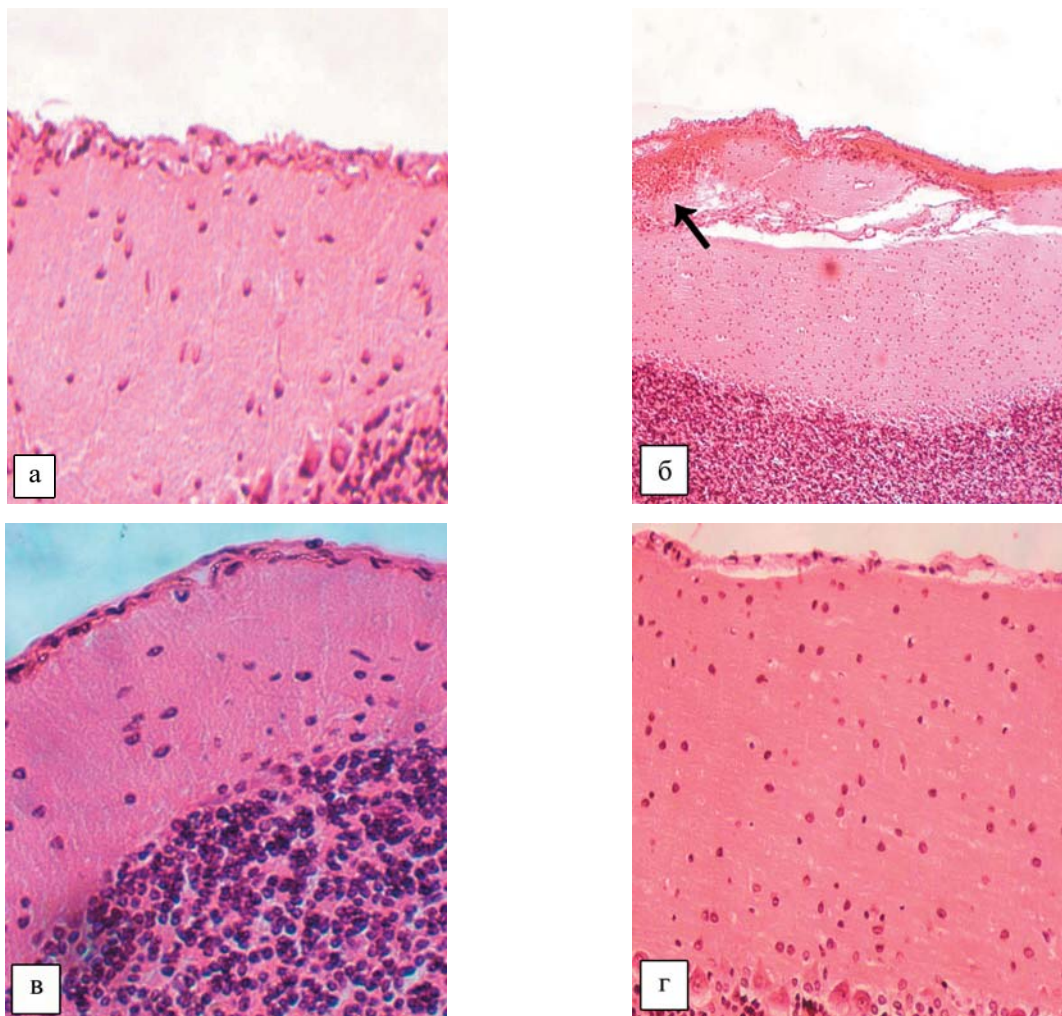
но між відростками та у просвіті шлуночка. Все це підтверджує факт руйнування стінки кровоносних судин мозкових оболонок у травмованих щурів.

При аналізі мікрорізів головного мозку тварин, яким вводили атристамін, виявлено, що у стінці мозкових шлуночків та у відростках судинних сплетінь відсутні або значно менш виражені набряк строми і розпушення епітеліального пласта. Відновлено однорядне розташування епітеліальних клітин. У той же час зберігається певне розширення просвіту звивистих капілярів відростків судинного сплетіння, заповнення їх еозинофільною рідиною, хоча крововиливи у порожнину шлуночків не спостерігались. Лише деякі ділянки стінки мозкових шлуночків (переважно четвертого) розривлені, епітеліальні клітини розташовані хаотично.

Неоднозначні результати були отримані для тварин, яких після ЧМТ піддавали лікуванню пірацетамом. У шлуночках головного мозку одних щурів стан відростків судинного сплетіння та стінки шлуночка був відносно нормальний. Спостерігали лише виразно розширені та повнокровні капіляри у прилеглих до стінки шлуночків зонах мозку (Рис. 5г). В інших тварин частина звивистих кровоносних капілярів відростків судинних сплетінь мала виразно стоншену судинну стінку, сплюснені епітеліальні клітини, була розширеною, містила залишки еозинофільної ніжно-сітчастої маси.

На основі отриманих даних можна зробити такі узагальнення. У щурів у результаті ЧМТ виникли ознаки порушення мозкового кровообігу, які на третій день посттравматичного періоду проявлялись застійною повнокровністю судин м'якої мозкової оболонки, речовини СМК великих півкуль та кори мозочка, субарахноїдальними та підоболонковими крововиливами,

Рисунок 4



Кора мозочка тварин:

- а — інтактної групи (×250);
- б — групи контрольної патології — ЧМТ (↑ — підоболонковий крововилив, ×100);
- в — групи атристаміну (×250);
- г — групи пірацетаму (×250).

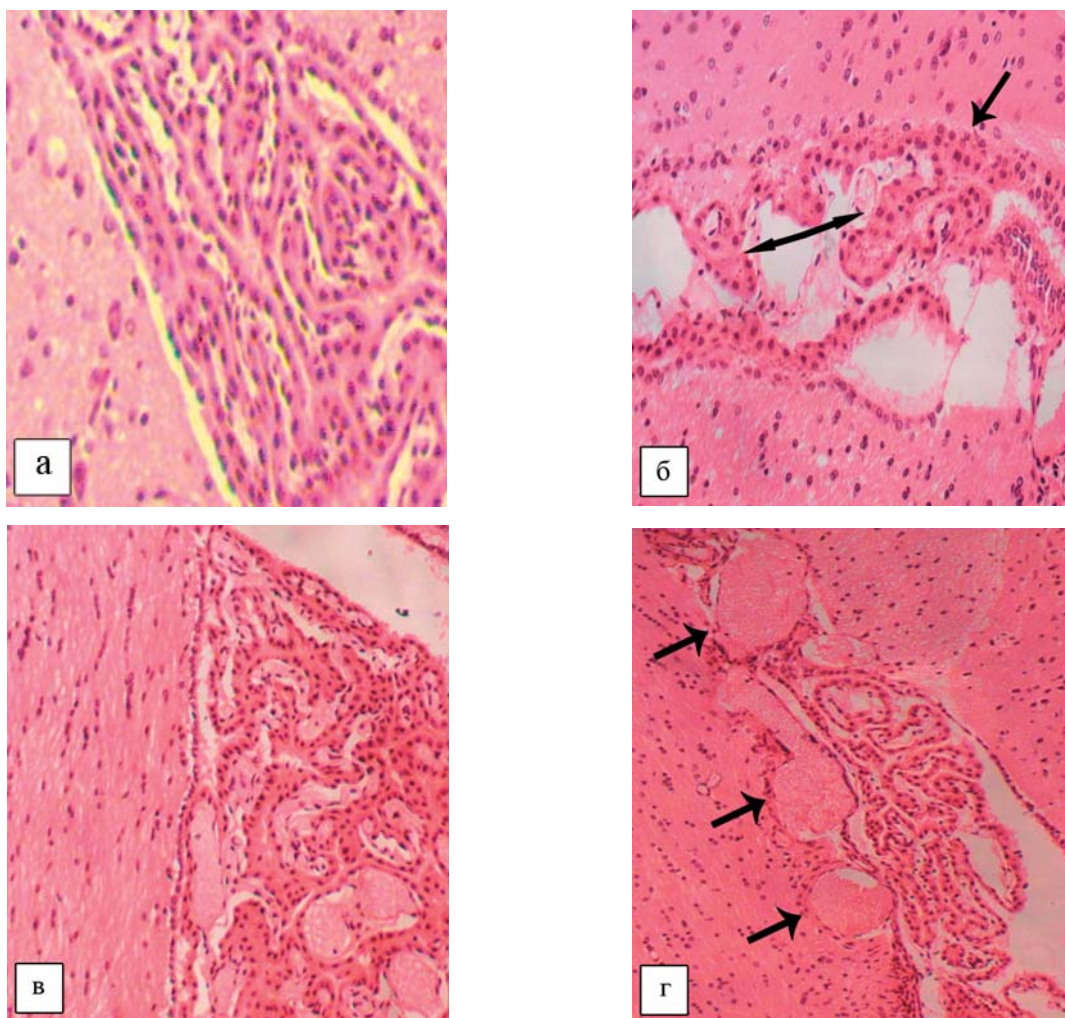
Забарвлення — гематоксилін та еозин.

змінюючи тонування судинної стінки (переважно тонкостінних судин), в окремих випадках — формуванням контузійних осередків. У судинних сплетіннях мозкових шлуночків також розвинулися ознаки мікроциркуляторних розладів з оклюзією просвіту судин фібриновими масами. Як наслідок, виникали вторинні явища у вигляді набряку (периваскулярного, перикапілярного, місцями перичелюлярного), що в свою чергу призводило до порушення трофіки нейронів. У результаті зменшилася чисельність життєстійких нейронів та збільшилася кількість нейронів з тим чи іншим ступенем метаболічних розладів, що викликало реакцію з боку глії (збільшився гліонейрональний індекс, перинейрональний

сателітний індекс), бо активація гліальних елементів є головним фактором забезпечення життєдіяльності нейронів при розвитку ішемічних порушень [15].

На основі результатів морфометричних вимірювань можна зробити висновок, що застосування атристаміну для лікування наслідків ЧМТ значною мірою покращує метаболічний та енергетичний стан пірамідних нейронів головного мозку щурів, що простежується за зменшенням сателітозу та послабленням реакції глії. При цьому даний позитивний вплив досліджуваної сполуки є більш вираженим, ніж у препарату порівняння пірацетаму. Слід зауважити, що результати морфометрії повністю

Рисунок 5



Ділянки судинних сплетінь бокових шлуночків головного мозку тварин:

а — інтактної групи ($\times 400$);

б — групи контрольної патології — ЧМТ (\uparrow — набряк строми стінок шлуночка та відростків судинного сплетіння, \downarrow — втрата однорядного розташування епітеліальних клітин, $\times 200$);

в — групи атристаміну ($\times 200$);

г — групи пірацетаму (\uparrow — повнокровність та виразне розширення капілярів у прилеглий до шлуночків зоні мозку, $\times 200$).

Забарвлення — гематоксилін та еозин.

співвідносяться із результатами, отриманими у попередніх дослідженнях нейропротекторних властивостей атристаміну із застосуванням поведінкових тестів [9].

Висновки

1. З метою поглибленого вивчення нейропротекторних властивостей 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону (атристаміну) в умовах експериментальної черепно-мозкової травми досліджено його вплив на морфологічні порушення, спричинені травмою, у сенсомоторній корі великих півкуль головного

мозку, корі мозочка, судинних сплетіннях у бокових (СМК) та у четвертому (мозочок) мозкових шлуночках щурів.

2. Після застосування атристаміну у щурів зменшилась виразність ознак розладу мікроциркуляції та набряку в усіх досліджених ділянках головного мозку, зменшилась чисельність нейронів із метаболічними розладами, що забезпечило зниження гліонейронального та перинейронального сателітного індексів порівняно з нелікованими тваринами, збільшилась кількість життєздатних нейронів.

3. За ступенем вираженості церебропротекторного впливу на морфологічний стан досліджених ділянок головного мозку щурів після ЧМТ атристамін (100 мг/кг) переважає препарат порівняння пірацетам (400 мг/кг), що повністю співвідноситься з результатами попередніх досліджень нейропротекторних властивостей атристаміну із застосуванням поведінкових тестів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Наказ МОЗ України № 34 від 15.01.2014 Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації екстренної медичної допомоги [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20140115_0034.html.

2. Rates of Major Depressive Disorder and Clinical Outcomes Following Traumatic Brain Injury / С.Н. Bombardier, J.R. Fann, N.R. Temkin et al. // JAMA. — 2010. — Vol. 303, № 19. — P. 1938-1945.

3. Fann J.R. Treatment for depression after traumatic brain injury: a systematic review / J.R. Fann, T. Hart, K.G. Schomer // Journal of Neurotrauma. — 2009. — Vol. 26, № 12. — P. 2383-2402.

4. 2-Метил-3-фениламинометилхинолин-4-он — потенциальный антидепрессант с ноотропными свойствами / С.Ю. Штрыголь, В.А. Зубков, И.Н. Подольский, И.С. Гриценко // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2012. — Т. 75, № 4. — С. 7-9.

5. Скринінгові дослідження 3-амінометил-2-метилхінолін-4-онів як потенційних психотропних засобів / С.Ю. Штрыголь, В.О. Зубков, І.С. Гриценко, І.М. Подольський, О.В. Шатілов // Клінічна фармація. — 2010. — Т. 14, № 1. — С. 35-38.

6. Антигіпоксична активність 2-метил-3-фениламинометилхинолін-4-ону — перспективного антидепрессанта з ноотропними властивостями / І.М. Подольський, С.Ю. Штрыголь, В.Ф. Осташко, Н.В. Бездітко // Український біофармацевтичний журнал. — 2013. — № 2 (25). — С. 46-49.

7. Подольський І.М. Вплив перспективного антидепрессанта з ноотропними властивостями 2-метил-3-фениламинометилхинолін-4-ону на фази пам'яті / І.М. Подольський, С.Ю. Штрыголь, І.С. Гриценко // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2013. — Т. 8, № 4. — С. 104-107.

8. Вплив похідних 3-амінометил-2-метилхінолін-4-ону на рівень моноамінів у головному мозку мишей / С.Ю. Штрыголь, В.О. Зубков, І.М. Подольський, І.С. Гриценко // Вісник фармації. — 2011. — № 1 (65). — С. 62-65.

9. Podolsky I.M. Neuroprotective activity of 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one in experimental traumatic brain injury in rats / I.M. Podolsky, S.Yu. Shtrygol // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. — 2015. — Vol. 7, № 4. — P. 518-524.

10. Ельский В.Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев. — Донецк: Новый мир, 2008. — 140 с.

11. Наказ МОЗ України № 24 від 17.01.2005. Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Медицина невідкладних станів» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20050117_24.html.

12. Шатілов О.В. Експериментальне вивчення ноотропних та церебропротекторних властивостей похідних (2-оксоіндоліліден-3)-оцтової кислоти [текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / О.В. Шатілов. — Одеса, 2014. — 20 с.

13. Жилияев С.О. Экспериментальне обґрунтування використання препаратів кверцетину в різних лікарських формах при черепно-мозковій травмі [текст]: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / С.О. Жилияев. — Харків, 2014. — 21 с.

14. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. — М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. — 424 с.

15. Медико-биологические исследования в гигиене / Р.В. Меркурьева, К.В. Суданов, Т.И. Бонашевская, В.С. Журков. — М.: Медицина, 1986. — 272 с.

16. Гордиенко Ж.П. Морфологическая характеристика головного мозга крыс при различных режимах воздействия физических факторов / Ж.П. Гордиенко, А.Н. Ситенко // Медико-техническое обеспечение учебно-научного процесса в морфологии: тез. докладов обл. научн. конф. — М.: Медицина, 1983. — С. 15-17.

17. Гуляев С.М. Морфологическая оценка церебропротекторного действия лантана ацетата при хронической ишемии головного мозга у крыс / С.М. Гуляев, И.О. Убашев, Н.М. Кожевникова // Морфология. — 2007. — Т. 132, № 4. — С. 24-27.

УДК 547.831.8:615.214.32+616.831-001:57.084.1

Резюме

Подольский И.Н., Штрыголь С.Ю., Ларьяновская Ю.Б. Национальный фармацевтический университет

Экспериментальное исследование церебропротекторного влияния 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она на морфологические нарушения в структурах головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы

В работе приведены результаты морфологического исследования церебропротекторного влияния 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она (атристамина) в дозе 100 мг/кг на нарушения в структурах головного мозга крыс в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Исследованы сенсомоторная кора больших полушарий головного мозга, кора мозжечка, сосудистые сплетения в мозговых желудочках крыс (боковых и четвертом). Проведен морфометрический анализ влияния исследуемого соединения и референс-препарата пирацетам на развитие морфологических признаков модельной патологии. Показано, что по выраженности церебропротекторного влияния на морфологическое состояние исследованных областей головного мозга крыс после ЧМТ атристамин (100 мг/кг) превосходит пирацетам (400 мг/кг), что полностью соотносится с результатами исследований нейропротекторных свойств атристамина с использованием поведенческих тестов.

Ключевые слова: 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-он, черепно-мозговая травма, нейропротекторная активность, морфологическое исследование.

UDC 547.831.8:615.214.32+616.831-001:57.084.1

Summary

Podolsky I.M., Shtrygol S.Yu., Laryanovska Yu.B. National University of Pharmacy, Kharkiv

Experimental research of cerebroprotective effect of 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one against morphological damages in rat brain structures after traumatic brain injury

This research has been carried out to study cerebroprotective effect of novel antidepressant 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one (atristamine) in dose 100 mg/kg against morphological damages in rat brain structures after traumatic brain injury (TBI). Design of this morphological research has been completely harmonized with the previous protocol, which was used for studying of neuroprotective properties of atristamine against TBI using behavioral tests.

The brain sensorimotor cortex, the cerebellar cortex, vascular plexuses in the lateral ventricles and the fourth ventricle have been investigated.

It has been shown that after treatment with atristamine the severity of signs of microcirculation disorders and edema significantly decreased in all investigated brain regions. Furthermore, the number of neurons with metabolic disorders was lower comparing with untreated animals that led to diminution of the glial-neuronal index and the perineuronal satellite index. The number of viable neurons in the atristamine-treated group of animals was increased. As a result of morphometric measurements it should be noted that the administration of atristamine for correction of TBI consequences improves metabolic and bioenergetic status of pyramidal neurons in rat brain, which is evident by decreased satellitose and attenuated glial reaction. Moreover, this positive impact of atristamine

(100 mg/kg) is more pronounced in comparison with reference drug piracetam (400 mg/kg).

Keywords: 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one, traumatic brain injury, neuroprotective activity, morphological research.

Подольський Ілля Миколайович. К.фарм.н. (2009), доцент (2012), доцент кафедри медичної хімії НФаУ.

Штриголь Сергій Юрійович. Д.мед.н. (2006), професор (2007), зав. кафедри фармакології НФаУ.

Лар'яновська Юлія Борисівна. К.біол.н. (1989), ст. наук. співроб. (2007) ЦНДЛ НФаУ.

УДК 616.831:616-005.4:612.823:616-091.8:577.112.6

Дейко Р.Д., Штриголь С.Ю., Лар'яновська Ю.Б., Колобов О.О.
Національний фармацевтичний університет
ФДУП «Державний НДІ особливо чистих біопрепаратів» ФМБА Росії

Вплив олігопептидів, аналогів ланки АКТГ₁₅₋₁₈, на гістоструктуру головного мозку щурів із моделлю гострого порушення мозкового кровообігу

На білих щурах змодельовано гостре порушення мозкового кровообігу шляхом білатеральної каротидної оклюзії. Досліджено вплив нейропептидів Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide та Acetyl-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-amide на морфологічні показники (індекс альтерації нейронів сенсомоторної кори великих півкуль та грушовидних клітин Пуркінє кори мозочка, перинейрональний та гліонейрональний сателітний індекси) та коефіцієнт маси головного мозку. Як препарат порівняння використано відомий церебропротектор семакс. Препарати вводили в дозі 20 мкг/кг інтраназально.

Результати досліджень засвідчили захисний вплив нейропептидів на стан мікрогемодинамічного русла та стан нейронів за умов церебральної ішемії. За більшістю показників олігопептиди були кращими за референс-препарат семакс.

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, нейропептиди, гістоструктура головного мозку, експеримент.

Вступ

Гострі порушення мозкового кровообігу (ГПМК) є другою за поширеністю причиною смертності серед хворих із ураженнями серцево-судинної системи та першою — серед хворих неврологічного профілю. Ішемічний інсульт, що переважає у структурі ГПМК, проявляється комплексом змін морфологічних характеристик головного мозку (ГМ) та, як наслідок, тяжким порушенням його функціональної активності [1, 2, 3].

За даними літератури [4], лікарські засоби нейрометаболічного профілю, як-от семакс, здатні коригувати зміни гістоструктури ГМ, що виникають на тлі ГПМК. Раніше нами виявлено церебропротекторні та сприятливі психотропні властивості низки аналогів ділянки АКТГ₁₅₋₁₈, а саме збільшення виживаності за ГПМК, виражена антигіпоксична та ноотропна активність при інтраназальному введенні [5]. Перевагою цих пептидів є висока стійкість до впливу пептидаз, що зумовлює тривалу дію за-

вдяки введенню до їхньої структури залишків D-амінокислот. Також для пептидів характерна низька токсичність, що підтверджено дослідженнями *in vitro* [6].

Мета роботи — з'ясувати вплив оригінальних олігопептидів КК-1 та КК-5 на гістоструктуру ГМ щурів за умови ГПМК.

Матеріали та методи

Олігопептиди КК-1 та КК-5 синтезовані в НДІ особливо чистих біопрепаратів під керівництвом д.б.н. Колобова О.О. і є хімічно модифікованими похідними ділянки АКТГ₁₅₋₁₈, структура яких, відповідно, Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide та Acetyl-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-amide. Ці олігопептиди відібрали для поглибленого вивчення за результатами попередніх досліджень церебропротекторної та супутніх видів психотропної активностей з-поміж 11 аналогічних сполук.

ГПМК моделювали шляхом незворотної білатеральної оклюзії загальних сонних артерій під пропофоловим наркозом (диприван, Fresenius Kabi, Австрія, 60 мг/кг внутрішньочеревно) на

білих щурах-самцях масою 180-220 г [7], що їх рандомізували на такі групи: 1 — псевдооперовані (усі етапи операції, окрім перев'язки судин, $n = 5$); 2 — контрольна патологія (ГПМК без лікування, $n = 31$); 3 — група тварин, що отримували лікування препаратом порівняння семаксом (семакс, НВЦ «Пептоген», Росія, $n = 15$); 4 — група тварин, що отримували лікування препаратом КК-1 ($n = 22$), 5 — лікування препаратом КК-5 ($n = 19$). Обидва досліджувані нейропептиди та референс-препарат семакс, обраний за критерієм пептидної природи та аналогічного шляху введення, вводили інтраназально у вигляді водних розчинів у дозі 20 мкг/кг, уперше — через 3-5 хв після виходу тварини з наркозу, далі — щодоби протягом 96 год постоклюзійного періоду. Тваринам перших двох груп інтраназально вводили еквівалентний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду.

Через 4 доби постоклюзійного періоду тварин декапітували та екстрагували ГМ, який зважували на торсійних вагах і фіксували 96 % розчином етанолу. Розраховували коефіцієнт маси мозку (КММ) за формулою:

$$КММ = \frac{M_{\text{мозку}}}{M_{\text{тварини}}} \times 100.$$

Досліджували морфологічний стан сенсомоторної кори (СМК) великих півкуль, судинних сплетінь бокових шлуночків та кори мозочка, для чого робили фронтальні розрізи на рівні передніх країв скроневих часток та кори мозочка. Зразки заливали у целоїдин-парафін, зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Для визначення функціональної активності нейронів зрізи додатково забарвлювали тіоніном за методикою Ніссля [8].

У СМК визначали індекс альтерації (відношення кількості пірамідних нейронів зі змінами різного типу до інтактних клітин — 3-й і 5-й шари), гліо-нейрональний індекс (відношення числа гліальних елементів до пірамідних нейронів — 5-й шар), перинейрональний сателітний індекс (кількість клітин сателітної глії на 1 нейрон). У корі мозочка визначали індекс альтерації (відношення числа ушкоджених клітин Пуркінє до нормальних — 2-й шар). Кількісний аналіз проводили у полі зору світлового мікроскопа Granum (окуляр 10, об'єктив 40) у 5 повтореннях. Мікрофотографування здійснювали цифровою відеокамерою Granum DCM 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2.4GHz за допомогою програми Tour View.

Усі експерименти виконано відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребет-

них тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [9].

Результати наведено у формі середньої величини та помилки середньої величини ($M \pm m$) та статистично оброблено з використанням t -критерію Стьюдента та кутового перетворення Фішера (для оцінки статистичної значущості змін виживаності). Міжгрупові відмінності вважали значущими за умови $p < 0.05$.

Результати та їх обговорення

Протягом 4 діб постоклюзійного періоду псевдооперовані щури лишалися живими та не виявили симптомів НД, а КММ становив 1.56 (Табл. 1). Результати оглядової мікроскопії вказали на нормальну гістоструктуру СМК великих півкуль та незмінений функціональний стан нейронів. Нейрони кори мозочка були також без ознак дистрофії. Чітко виділялися непорушена тришарова структура, середній шар грушоподібних клітин Пуркінє із тигроїдом нормального стану та прилеглий до гангліонарного зернистий шар без функціональних змін (Рис. 1). Кількісні показники морфологічного стану СМК та кори мозочка відповідали норми для даного виду тварин (Табл. 2).

Тварини групи КП почали гинути вже впродовж першої доби постоклюзійного періоду. До кінця 4-ї доби летальність у групі становила 77.4 %.

Гостра ішемія призвела до вазогенного набряку ГМ та збільшення КММ до 1.64. Судини СМК великих півкуль були повнокровними, розширеними та затромбованими (Рис. 2). Подекуди їх стінка була зруйнованою і спостерігалися явища діapedезу та крововиливу у сусідні ділянки мозкової речовини. Наслідком периваскулярного набряку стали деструкція цитоархітектоніки шарів кори ГМ, вогнищевий енцефалолізис та дегенерація ядер пірамідних нейронів (каріорексис, каріопікноз, каріолізис). Індекс альтерації зріс у 2.1 рази порівняно із показником псевдооперованих щурів ($p < 0.05$).

Візуально спостерігали некротично та апоптотично змінені нейрони із явищами лізису тигроїда та вакуолізацією цитоплазми (Рис. 3), що є свідченням зменшення енергетичних та пластичних ресурсів цих клітин [2].

Гліоцитоз дефектних нейронів та перинейрональний сателітоліз, що спостерігали візуально, підтверджуються морфометричними показниками. Перинейрональний сателітний індекс зріс більше ніж у 2 рази порівняно із показником групи псевдооперованих щурів ($p < 0.05$), а гліонейрональний — на 36.45 % ($p < 0.05$).

Патоморфологічні зміни кори мозочка були ідентичними таким у СМК великих півкуль. Спостерігали поодинокі крововиливи у молекулярному та гангліонарному шарах, застійну повнокровність капілярів — у зернистому шарі (Рис. 4). Візуально визначалося зменшення кількості клітин Пуркіньє та зростання серед них числа дегенеративних. Індекс альтерації у гангліонарному шарі збільшився на 25.8 % порівняно із групою псевдооперованих тварин ($p < 0.05$).

Семакс у щурів із ішемією зменшив летальність до 40 % ($p < 0.05$ проти групи КП). КММ на тлі його застосування становив 1.48, що свідчить про протинабряковий ефект препарату.

У полі зору мікроскопа не спостерігали енцефалолізу. Порівняно з групою КП значно зменшилися перинейрональний сателітний та гліонейрональний індекси (на 47.2 % та 16.4 % відповідно, $p < 0.05$). Однак, близько 20 % нейронів мали ознаки дистрофії (Рис. 5). Стан капілярів м'якої оболонки та судинних сплетінь бокових шлуночків варіював від нормального до патологічно зміненого. Частина їх розши-

рена та затромбована, деякі — у стані спазму. Спостерігали судини із порушенням стінки та виходом еритроцитів у перивазальний простір. Прояви перицелюлярного набряку були менш вираженими порівняно із групою КП (Рис. 5).

Однак стабілізація гідродинамічних показників за умови лікування семаксом супроводжувалася ушкодженням нейронів СМК та клітин Пуркіньє, що підтверджено морфометрично. Так, індекси альтерації пірамідних нейронів СМК та нейроцитів мозочка були зіставними з такими групи КП ($p > 0.05$). Отже, зменшення НД обумовлене, скоріше, ліквідацією вазогенного набряку, а не нормалізацією дисфункції нейроцитів, що є критичним механізмом ішемічного ураження в перші години та дні.

На тлі застосування пептидів КК-1 і КК-5 летальність становить 50 % ($p < 0.05$ проти групи КП) та 57.9 % ($p > 0.05$) відповідно, що не має статистично значущих відмінностей із цим показником на тлі семаксу. На відміну від семаксу, лікування фармакологічними препаратами КК-1 та КК-5 коригувало не лише прояви вазогенного компонента ішемії, а й ступінь ушкодження

Таблиця 1

Порівняльний вплив нейроактивних пептидів на виживаність і коефіцієнт маси мозку щурів із моделлю гострого порушення мозкового кровообігу

Група, препарат, n	Вживаність, n (%)				Коефіцієнт маси мозку
	24 год	48 год	72 год	96 год	
ПО, n = 5	0*	0*	0*	0*	1.56±0.12
КП, n = 31	11 (35.5 %)	9 (29 %)	8 (25.8 %)	7 (22.6 %)	1.64±0.08
Семакс, n = 15	11 (73.3 %)*	9 (60 %)*	9 (60 %)*	9 (60 %)*	1.48±0.17
КК-1, n = 22	20 (91 %)*^	13 (59 %)*	13 (59 %)*	11 (50 %)*	1.40±0.05*
КК-5, n = 19	12 (63 %)	9 (47 %)	8 (42.1 %)	8 (42.1 %)	1.50±0.07

Примітки.

ПО — група псевдооперованих тварин.

КП — група контрольної патології.

* — статистично значущі відмінності з групою контрольної патології ($p < 0.05$).

^ — статистично значущі відмінності з групою тварин, що отримувала лікування семаксом ($p < 0.05$).

Таблиця 2

Кількісні показники стану СМК великих півкуль та кори мозочка щурів, використаних у експерименті

Група, кількість тварин	Показники			
	СМК великих півкуль			Кора мозочка
	Індекс альтерації пірамідних нейронів	Гліонейрональний індекс	Перинейрональний сателітний індекс	Індекс альтерації клітин Пуркіньє
ПО, n = 5	0.037±0.0014	0.535±0.006	1.25±0.06	0.062±0.006
КП, n = 6	0.077±0.0026*	0.730±0.013*	2.65±0.12*	0.078±0.0038*
Семакс, n = 5	0.077±0.0014**	0.61±0.016**/**	1.40±0.06**	0.077±0.0033*
КК-1, n = 7	0.063±0.0017*/**	0.62±0.016*/**	1.40±0.06**	0.074±0.0036
КК-5, n = 5	0.058±0.002*/**/**	0.58±0.017*/**	1.30±0.06**	0.073±0.0031

Примітки.

ПО — група псевдооперованих тварин.

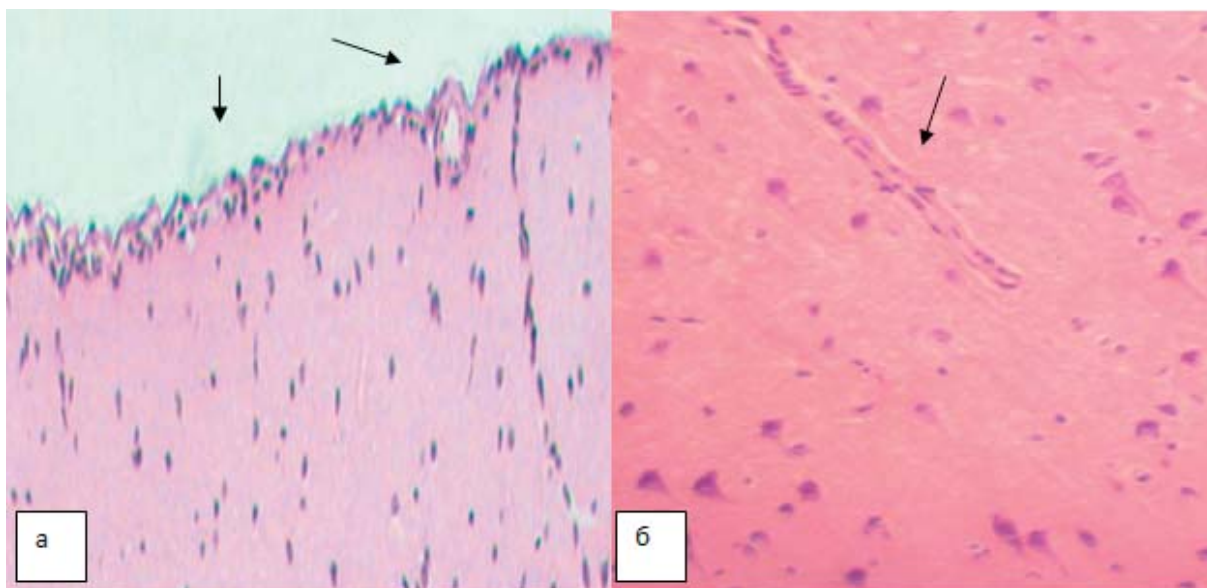
КП — група контрольної патології.

* — статистично значущі відмінності з групою псевдооперованих тварин ($p < 0.05$).

** — статистично значущі відмінності з групою контрольної патології ($p < 0.05$).

*** — статистично значущі відмінності з групою тварин, що отримувала лікування семаксом ($p < 0.05$).

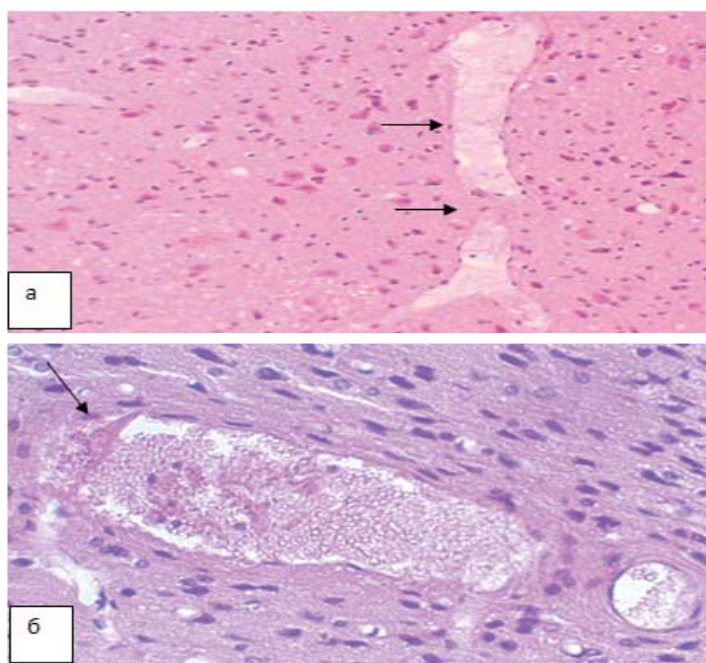
Рисунок 1



Головний мозок псевдооперованих щурів через 4 доби після оперативного втручання. Ділянка сенсомоторної кори великої півкулі. Гематоксилін-еозин.

- а — нормальний стан судин м'якої мозкової оболонки (стрілки, $\times 200$);
- б — незмінений стан капілярів у тканині мозку (стрілка, $\times 200$).

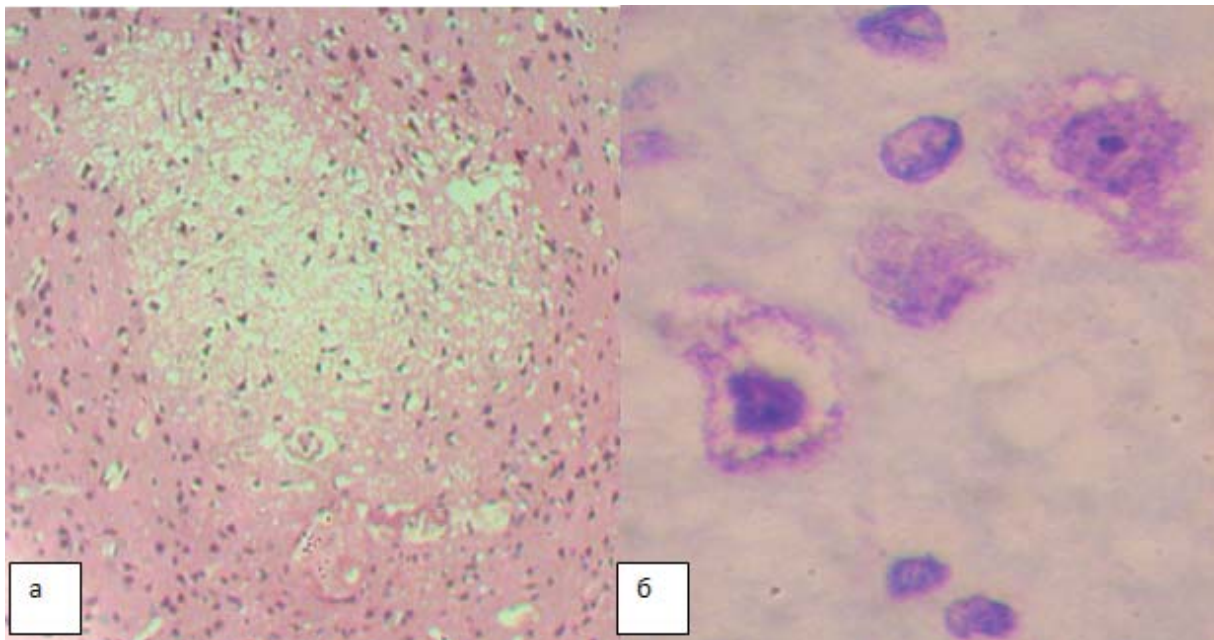
Рисунок 2



Головний мозок щурів через 4 доби після білатеральної оклюзії загальних сонних артерій (контрольна патологія). Ділянка сенсомоторної кори великої півкулі. Гематоксилін-еозин.

- а — повнокровність венозних судин (стрілки, $\times 200$);
- б — руйнація стінки судини з діapedезом еритроцитів (стрілка, $\times 250$).

Рисунок 3

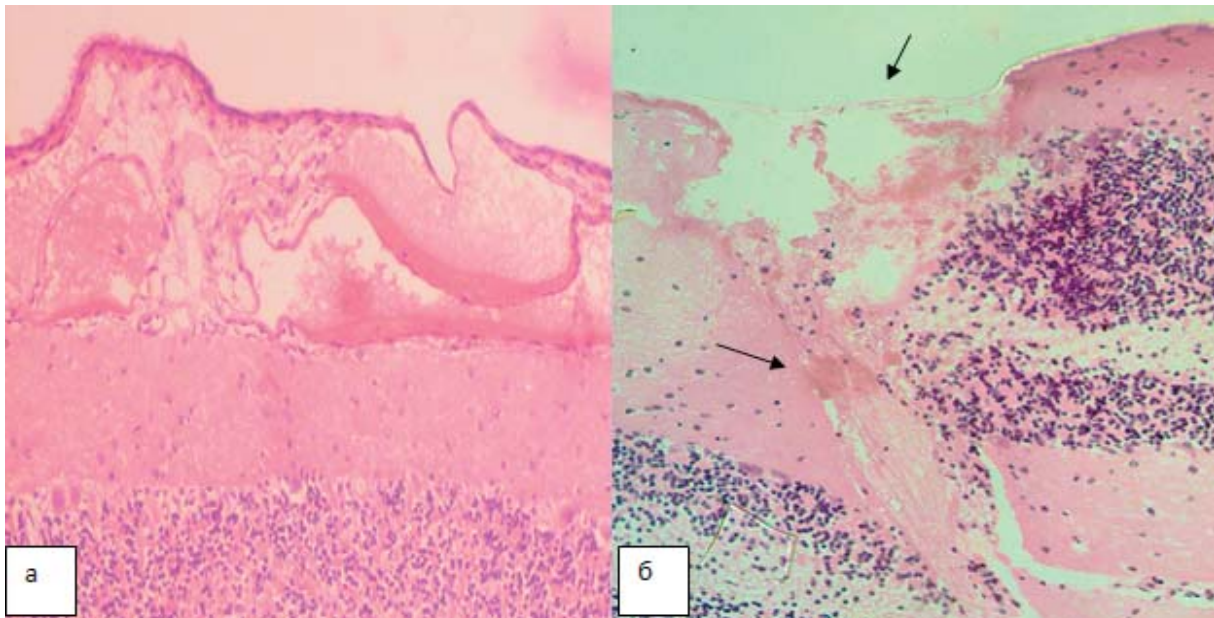


Головний мозок щурів через 4 доби після білатеральної оклюзії загальних сонних артерій (контрольна патологія). Ділянка сенсомоторної кори великої півкулі.

а — ділянка енцефалолізу, гематоксилін-еозин ($\times 200$);

б — хроматоліз та вакуолізація цитоплазми нейронів, тіонін за методикою Ніссля ($\times 400$).

Рисунок 4

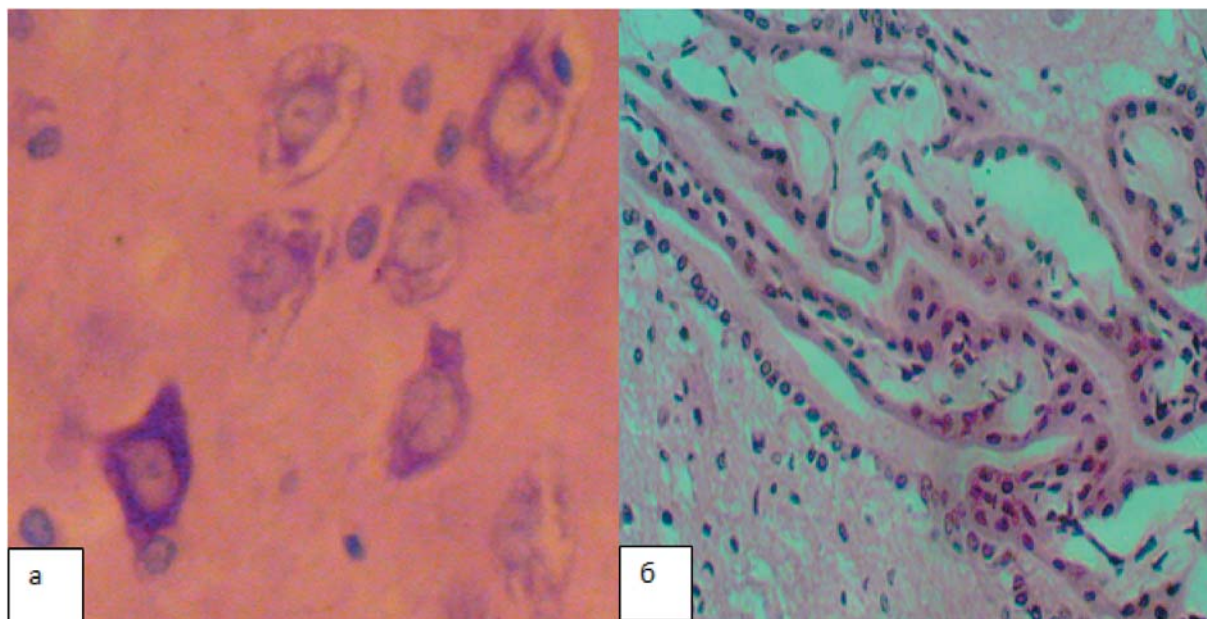


Головний мозок щурів через 4 доби після білатеральної оклюзії загальних сонних артерій (контрольна патологія). Кора мозочка.

а — виразне розширення та повнокровність судин м'якої мозкової оболонки ($\times 100$);

б — крововилив у тканину мозочка (стрілки, гематоксилін-еозин, $\times 200$).

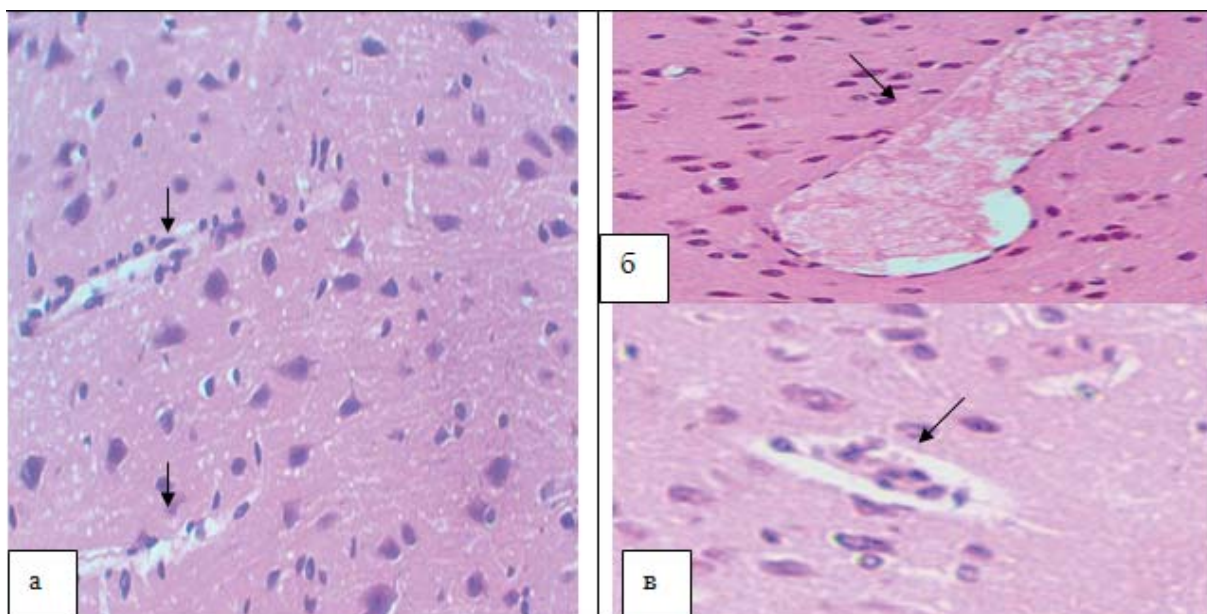
Рисунок 5



Головний мозок щурів, яким вводили семакс, через 4 доби після каротидної оклюзії

- а — ділянка сенсомоторної кори великої півкулі: вакуолізація, хроматоліз тигроїда у цитоплазмі нейронів (×400), тіонін за методикою Ніссля;
- б — ділянка судинного сплетіння бокового шлуночка: розширення та повнокровність частини капілярів (гематоксилін-еозин, ×250).

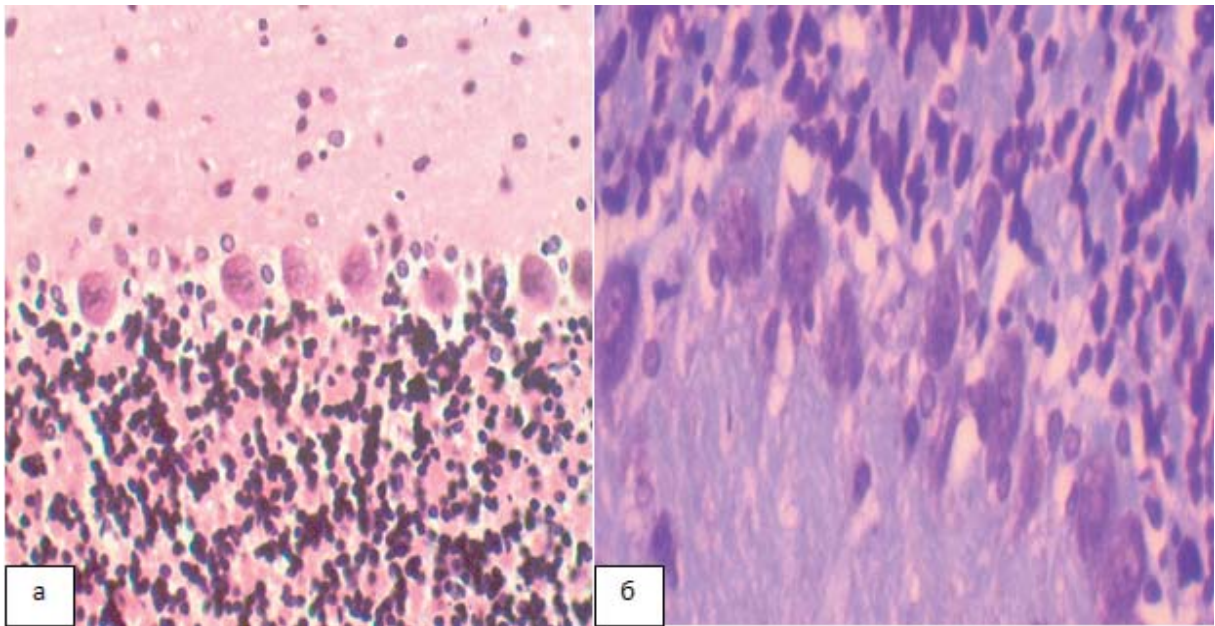
Рисунок 6



Головний мозок щурів, яким вводили пептид КК-1, через 4 доби після білатеральної каротидної оклюзії. Ділянка сенсомоторної кори великої півкулі.

- а — нормальний стан капілярів (стрілки);
- б — розширений та повнокровний капіляр (стрілка);
- в — кровоносна судина у стані спазму (стрілка). Гематоксилін-еозин (×200).

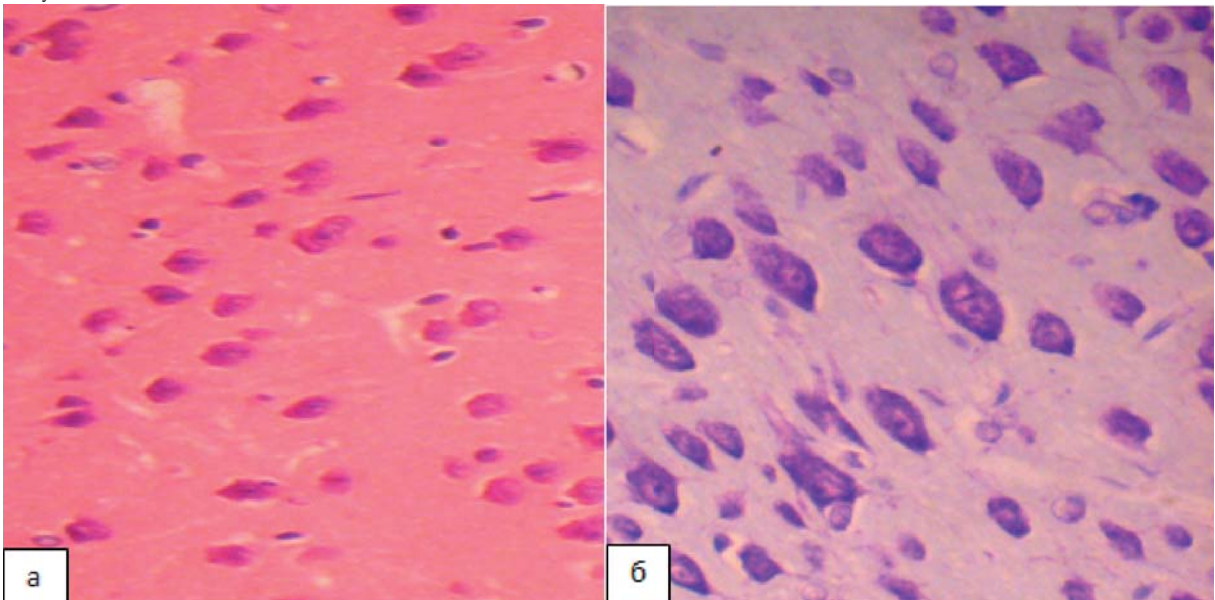
Рисунок 7



Головний мозок щурів, яким вводили пептид КК-1, через 4 доби після білатеральної каротидної оклюзії. Кора мозочка.

- а, б — нормальний структурно-функціональний стан клітин Пуркінє;
 а — гематоксилін-еозин, $\times 200$;
 б — тіонін за методикою Нісся, $\times 250$.

Рисунок 8



Головний мозок щурів, яким вводили препарат КК-5, через 4 доби після білатеральної каротидної оклюзії. Ділянка сенсомоторної кори великої півкулі.

- а — нормальний стан більшості нейронів, нейропілю, виразне зменшення сателітозу (гематоксилін-еозин, $\times 200$);
 б — функціонально активні нейрони (тіонін за методикою Нісся, $\times 250$).

нейроцитів СМК. Так, індекси альтерації пірамідних нейронів СМК зменшилися порівняно з групою семаксу на 18.2 % і 24.7 % ($p < 0.05$) для КК-1 та КК-5, відповідно. Захисний вплив на грушовидні клітини Пуркінє досліджувані олігопептиди виявили на рівні референс-препарату, статистично незначучо зменшуючи ступінь їх ураження порівняно з групою КП.

Крововиливи в товщу СМК та кору мозочка були відсутніми у тварин, що отримували лікування КК-1. Капіляри глибоких шарів та судинних сплетінь бокових шлуночків подекуди були повнокровними або в стані спазму, проте більша їх частина мала нормальний вигляд. Пептид КК-1 зменшував набряк ГМ, КММ становив 1.40. Про нормалізацію стану тканини мозку свідчили також результати оглядової мікроскопії: перичелюлярний набряк був практично відсутнім, а периваскулярний — менш вираженим порівняно з таким у групі КП та семаксу (Рис. 6). Оглядова мікроскопія показала наблизений до нормального стану цитоархітектоники кори мозочка та значно менші ознаки дистрофії клітин Пуркінє (Рис. 7). Отже, КК-1 у щурів із ГПМК чинив виразніший за семакс захисний вплив на нейроцити СМК та мозочка.

Пептид КК-5 також чинив лікувальний ефект. Зокрема, особливо виразним він виявився щодо стану мікрогемодинамічного русла тканини ГМ. Мікроскопічно відзначено зменшення кількості судин у стані спазму та/або екстазії, більшість їх мала нормальний вигляд (Рис. 8). Пептид КК-5 ліквідував вазогенний набряк (як перичелюлярний, так і периваскулярний його компоненти) та, як наслідок, нормалізував КММ до 1.50. Здатність досліджуваних пептидів позитивно впливати на набряк ГМ обумовлена, можливо, наявністю у їх структурі L-лізину, що є ефективним протинабряковим засобом [10].

На тлі лікування нейропептидом КК-5 індекс альтерації пірамідних нейронів СМК великих півкуль зменшився на 25 % порівняно з показником групи КП ($p < 0.05$), у той час як референс-препарат семакс практично не впливав на нього. Виявлено також зменшення числа сателітної глії наполовину порівняно з відповідним показником щурів групи КП ($p < 0.05$). Лікування препаратом КК-5 максимально знижує гліонейрональний індекс (на 20.5 %, $p < 0.05$ з групою КП), що підтверджує результати оглядової мікроскопії щодо зменшення числа дефектних нейронів та таких, що мають ознаки необоротних ушкоджень і піддаються гліоцитозу.

Отже, пептиди КК-1 та КК-5 виявляють нейропротекторні властивості на моделі ГПМК за

ішемічним типом у щурів, що проявляється у нормалізації мікрогемодинамічного русла та усуненні набряку ГМ, а також у покращанні стану нейроцитів СМК великих півкуль та кори мозочка, про що свідчать результати оглядової мікроскопії та морфометричні показники.

Висновки

За умови модельного гострого порушення мозкового кровообігу розвиваються тяжкі морфологічні зміни головного мозку та його набряк, характерні для ішемічного інсульту. Лікування щурів із церебральною ішемією оригінальними препаратами олігопептидної природи КК-1 та КК-5 знижує летальність і демонструє виразний терапевтичний ефект, що за більшістю показників перевищує дію відомого церебропротектора та ноотропа семаксу.

Нейропептид КК-1 зменшує набряк головного мозку та нормалізує коефіцієнт його маси (1.40 проти 1.56 в групі контрольної патології). Стабілізується гістоструктура сенсомоторної кори великих півкуль та кори мозочка: нормалізується цитоархітектоника шарів, зменшуються ознаки дистрофії клітин Пуркінє та пірамідних нейронів. До кінця 4-ї доби спостереження летальність щурів у групі є зіставною із показником препарату порівняння семаксу.

Нейроактивний пептид КК-5 покращує стан мікрогемодинамічного русла головного мозку, зменшує коефіцієнт маси мозку (1.50 проти 1.56 в групі контрольної патології). Морфометрично відзначено превентивну дію препарату щодо альтерації пірамідних нейронів сенсомоторної кори в умовах фокальної ішемії. На тлі введення КК-5 виживаність щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу була меншою, ніж за умови застосування КК-1 чи семаксу. Проте, за морфометричними показниками КК-5 виявив максимальний нейропротекторний ефект.

Результати вивчення гістоструктури головного мозку щурів із моделлю церебральної ішемії підтверджують церебропротекторну активність оригінальних олігопептидів КК-1 та КК-5, виявлену в попередніх дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гуляев С.М. Морфологическая оценка церебропротекторного действия лантана ацетата при хронической ишемии головного мозга у крыс // Морфология. — 2007. — Т. 132, № 4. — С. 24-27.
2. Острая церебральная недостаточность / В.И. Черный, В.Н. Ельский, Г.А. Городник, А.Н. Колесников. — Донецк: ООО «ИПП «Промінь», 2007. — 514 с.
3. Царенко С.В. Интенсивная терапия заболеланий и поврежденный мозга / С.В. Царенко, В.В. Крылов // Неврологический журнал. — 2005. — № 2. — С. 9-13.

4. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс] / Мін-во охорони здоров'я України, Держ. експертний центр МОЗ. — Режим доступу: <http://www.drllz.kiev.ua>.
5. Дейко Р.Д. Экспериментальное исследование церебропротекторных и антиамнестических свойств новых нейроактивных пептидов / Р.Д. Дейко, С.Ю. Штрыголь, А.А. Колобов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* — 2013. — Т. 11. — С. 46.
6. Ковалицкая Ю.А. Стресс-протекторная активность синтетического пептида $\text{CH}_3\text{CO-Lys-Lys-Arg-Arg-NH}_2$ (протектина) / Ю.А. Ковалицкая, В.Б. Садовников, Ю.А. Золотарев, Е.В. Наволоцкая // *Биоорг. химия.* — 2009. — № 35 (4). — С. 493-500.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. докт. мед. наук А.Н. Миронова. — Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for the experimental and other scientific purposes [Text]: European Treaty Series No. 123: Text amended according to the provisions of the Protocol (ETS No. 170), as of its entry into force, on 2 December 2005. Strasbourg, 1986. — 48 P.
9. Машковский М.Д. / Лекарственные средства: в 2 т. Т. 1. — 14-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: ООО «Издательство Новая Волна»: Издатель С.Б. Дивов, 2002. — 540 с.
10. Данилова Т.Г. Морфология лобной коры больших полушарий крыс при пережатии общей сонной артерии / Т.Г. Данилова // *Вестник Новгородского государственного университета.* — 2013. — № 71, Т. 1. — С. 101-105.

УДК 616.831:616-005.4:612.823:616-091.8:577.112.6

Резюме

Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Ларьяновская Ю.Б., Колобов А.А.

Национальный фармацевтический университет ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Влияние олигопептидов, аналогов участка АКГГ₁₅₋₁₈ на гистоструктуру головного мозга крыс с моделью острого нарушения мозгового кровообращения

На белых крысах смоделировано острое нарушение мозгового кровообращения путем билатеральной каротидной окклюзии. Исследовано влияние нейропептидов Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide и Acetyl-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-amide на морфологические показатели (индекс альтерации нейронов сенсомоторной коры больших полушарий и грушевидных клеток Пуркинне коры мозжечка, перинеурональный и глионейрональный сателлитный индексы) и коэффициент массы головного мозга. Как препарат сравнения использован известный церебропротектор семакс. Препараты вводили в дозе 20 мкг/кг интраназально.

Результаты исследования показали защитное действие нейропептидов на состояние микроциркуляторного русла и состояние нейронов в условиях церебральной ишемии. По большинству показателей исследуемые олигопептиды превосходили референс-препарат семакс.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, нейропептиды, гистоструктура головного мозга, эксперимент.

UDC 616.831:616-005.4:612.823:616-091.8:577.112.6

Summary

Deiko R.D., Shtrygol' S.Yu., Laryanovskaya Yu.B., Kolobov O.O.

National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

The influence of oligopeptides analogues of sequence of АСГГ₁₅₋₁₈ on the histostructure of rat brain with the cerebral ischemia model

The effects of the novel peptidergic neuroprotectors in reducing ischemic brain damage have been examined on white rats. The cerebral ischemia produced by bilateral carotid occlusion with using of propofol narcosis (60 mg/kg). For 96 hours rats with cerebral ischemia were treated with novel peptides Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (KK-1) and Acetyl-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-amide (KK-5). The rat's treatment being initiated 1 h after the induction of cerebral ischemia. After 4 days of peptides administration the brain of the rats has extracted and preserved by ethanol 96 per cent. Investigated the influence of KK-1 and KK-5 on the brain histological structure (somatosensory cortex and cerebellum), brain morphological parameters (index of alteration of neurons, perineuronal and glioneuronal satellite index, index of alteration of Purkinje cells) and the ratio of brain mass. As a reference drug used known neuroprotective drug semax. The drugs was administered to rats intranasally at the dose 20 µg/kg.

The results of investigation confirmed the protective effect of neuropeptides on the state the blood microcirculation in brain and neurons under the conditions of cerebral ischemia. It was found that both investigated drugs (KK-1 and KK-5) statistically significant prevent the brain edema. The tetrapeptide KK-1 also statistically significant increased rat's survival with cerebral ischemia (to 50 %), decreased index of neuron's alteration, perineuronal and glioneuronal satellite index in somatosensory cortex, but not index of alteration of Purkinje cells in cerebellum.

The neuroprotective action of tetrapeptide KK-5 has manifested by the ability to decrease the index of alteration of Purkinje cells in cerebellum.

By most measures the investigated peptides exceed the reference drug semax. The peptides KK-1 and KK-5 are promising for the future experimental and clinical investigations.

Keywords: acute stroke, neuropeptides, brain histological structure, experiment.

Дейко Роман Данилович. Аспирант кафедры фармакології НФаУ, магістр фармації.

Штрыголь Сергій Юрійович. Д.мед.н., професор, завідувач кафедри фармакології НФаУ, дійсний член Всеукраїнської громадської організації «Асоціація фармакологів України» та Міжнародного союзу фундаментальної та клінічної фармакології «IUPHAR».

Лар'яновська Юлія Борисівна. К.б.н., старший науковий співробітник Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ.

Колобов Олександр Олександрович. Д.б.н., завідувач лабораторії синтезу пептидів НДІ особливо чистих біопрепаратів, м. Санкт-Петербург.