

## Зміст

<b>До 10-річчя ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»</b> .....	3
<b>В.П. Георгієвський. До 65-річчя з дня народження</b> .....	3
<b>Журналу «ФАРМАКОМ» – 10 років</b> .....	10
<b>У ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»</b>	
<i>Ляпунов М.О., Безугла О.П., Терно І.С., Котов А.Г.</i> Фармакопейні методи віскозиметрії при фармацевтичній розробці, виробництві та контролі якості рідких і м'яких лікарських засобів .....	11
<i>Ляпунов М.О., Столпер Ю.М.</i> Фармако-технологічний тест «Стійкість супозиторіїв і песаріїв до руйнування» при фармацевтичній розробці, виробництві та контролі якості готових лікарських засобів .....	22
<b>До впровадження Державної Фармакопеї України</b>	
<i>Георгієвський В.П., Чайка Л.О., Хованська Н.П., Гомон О.М., Меркулова Ю.В.</i> Біологічні методи контролю якості лікарських засобів у Державній Фармакопеї України .....	27
<i>Меркулова Ю.В., Гомон О.М., Чайка Л.О., Хованська Н.П.</i> Визначення вмісту бактеріальних ендотоксинів (ЛАЛ-тест) – фармакопейний метод. Повідомлення 1. ....	37
<i>Гризодуб О.І.</i> Валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів відповідно до вимог ДФУ .....	42
<i>Жемерова К.Г., Кобзар Г.І., Хованська Н.П.</i> До питання контролю мікробіологічної чистоти лікарських засобів відповідно до вимог ДФУ. Повідомлення 1. Перевірка придатності методик визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів .....	51
<b>До видання Доповнення до Державної Фармакопеї України</b>	
Етанол (96 %) .....	56
Етанол безводний .....	62
<i>Товмасян Є.К.</i> Про проекти монографій ДФУ «Вода для ін'єкцій», «Вода високоочищена» і «Вода очищена» .....	67
Вода для ін'єкцій .....	71
Вода високоочищена .....	72
Вода очищена .....	73
<b>Міжнародні конгреси, семінари, виставки</b>	
<i>Маслова Н.Ф., Чайка Л.О., Лібіна В.В., Півень О.П.</i> Інформація про ІХ Російський національний конгрес «Людина та ліки» .....	75
<b>Проблеми. Пошук. Рішення.</b>	
Комбіновані таблетки з фіксованим дозуванням для лікування туберкульозу .....	84
Коментар Сура С.В., заступника Головного державного інспектора України з контролю якості лікарських засобів, експерта ВООЗ в Україні .....	102
<i>Леонтьєв Д.А., Гризодуб О.І., Левін М.Г., Доценко Т.М.</i> Атестація фармацевтичних стандартних зразків: вивчення однорідності .....	104
<i>Фетісова О.Г.</i> Спеціалізована інформаційна система "Офто" – джерело інформації у повсякденній роботі .....	117
<b>Фітохімічні дослідження</b>	
<i>Литвиненко В.І., Мартинов А.В., Попова Н.В., Кожух І.А.</i> Деякі технологічні та біофармацевтичні особливості екстракції лектинів бадану .....	123
<i>Горєв І.В., Краснікова Т.О., Ковальова А.М., Комісаренко А.М., Крюкова Я. С.</i> Фармакогностичне дослідження <i>Strophanthus gratus</i> Franch. ....	127
<b>Одержання лікарських і допоміжних речовин</b>	
<i>Зайцев О.І.</i> Вивчення пролонгованого вивільнення декаметоксину з лікарської субстанції Декацеол .....	131

<i>Рой І.Д., Левітін Є.Я., Тульський Г.Г., Онопрієнко Т.О.</i> Одержання магнітних рідин для медичних цілей .....	134
<b><u>Ферменти</u></b>	
<i>Січкара Л.А., Діхтярьов С.І., Сухінін В.М.</i> Одержання лікарської рослинної субстанції інгібітора трипсину .....	137
<b><u>Готові лікарські засоби</u></b>	
<i>Шакіна Т.Н., Компанєць Є.І., Перешивайло Т.М., Хомякова Л.Г., Ефоян А.С., Волков В.В.</i> Шляхи вирішення озонової проблеми в галузі виробництва фармацевтичних аерозолів на АТ "Стома" .....	141
<i>Чепелюк В.І.</i> Розробка промислових технологій одержання таблеток із гастрорезистентним покриттям .....	145
<i>Сліпченко Г.Д.</i> Розробка оптимального складу та технології виробництва препаратів для лікування залізодефіцитних анемії .....	150
<b><u>Рослинні препарати та їх фармакологічна дія</u></b>	
<i>Антонюк В.О., Рибак О. В.</i> Вивчення вуглеводної специфічності лектинів підземних органів ехінацеї пурпурової та рудбекії роздільнолистої .....	153
<i>Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М., Герасимова О.О.</i> Трава гороху посівного — джерело одержання лікарських засобів .....	158
<i>Борисенко О.І., Кисличенко В.С., Васильченко Є.О.</i> Береза бородавчаста: фармакотерапевтичні властивості, медичне застосування, власні дослідження впливу настоек на функції нирок .....	163
<b><u>Фармакологічні дослідження</u></b>	
<i>Бондарєв Є.В., Рибачук Д.В.</i> Експериментальне дослідження можливості використання нового ентеросорбенту цеоліту при лікуванні виразкової хвороби шлунка .....	168
<i>Кисличенко В.С., Ткаченко О.Ю., Кузнецова В.Ю.</i> Вивчення токсичних властивостей полісахаридного комплексу з листя смородини чорної .....	171
<i>Топчієва Ш.А.</i> Флуоресцентні зонди у дослідженні зміної отрути .....	174
<i>Немятих О.Д.</i> Вплив координаційної сполуки германію з нікотиновою кислотою на окисно-антиоксидантну рівновагу в мозку щурів із гіпоксією замкнутого простору .....	180
<b><u>Маркетингові дослідження</u></b>	
<i>Півень О.П.</i> Перспективи розширення номенклатури комбінованих антигіпертензивних засобів за рахунок препаратів із групи інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту .....	185

**До 10-річчя ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»****25 червня 2002 року відбулися урочистості, присвячені 10-річчю діяльності Державного підприємства «Науково-експертний фармакопейний центр»**

Колектив Фармакопейного центру із ювілеєм привітав  
Президент України Леонід Данилович Кучма

Щиро вітаю з 10-річчям від дня заснування Науково-експертного фармакопейного центру.

За час існування центр розвинувся у добре оснащену і структуровану організацію, яка робить значний внесок у процес інтеграції України до Європейського Співтовариства. Сьогодні Ваша установа веде велику плідну роботу з експертизи нормативно-аналітичної документації вітчизняних та зарубіжних препаратів, виконує дослідження з контролю якості та стандартизації лікарських засобів, адже виробництво вітчизняних ліків, надійний контроль їх якості, створення системи перевірки імпорту такої специфічної продукції займає особливе місце в соціально-економічному становищі України, поліпшенні здоров'я і добробуту людей.

Держава чекає від вас нових наукових розробок, спрямованих на підвищення якості медичної допомоги співгромадянам.

Бажаю вам подальшої плідної роботи, натхнення і всіляких гараздів.

Президент України Л. Кучма

Поздоровлення надійшли від Національної академії наук України

Шановні колеги!

Від імені Національної академії наук України і себе особисто щиро вітаю Вас із нагоди 10-річчя від дня заснування Вашого центру.

За роки свого існування Ви створили національну систему аналітичної нормативної документації на лікарські засоби, розробили і увели в дію першу в історії незалежної України Державну Фармакопею, забезпечуючи і підтримуючи високий рівень стандартів якості лікарських засобів. Тому неможливо переоцінити Ваш вклад у збереження здоров'я населення нашої країни.

Ваш центр перетворився у провідну установу України, унікальну в СНД за своїм профілем, чії роботи отримали визнання міжнародної наукової громадськості. Із 1998 року Україна в особі Вашого Центру - єдина із країн СНД отримала статус спостерігача в Європейській Фармакопеї.

Приємно відзначити, що Ваш колектив сьогодні є згуртованою командою односторонців і професіоналів, яким під силу долати труднощі нинішніх часів та підкорювати нові вершини.

Щиро зичимо усім Вам доброго здоров'я, щастя, подальших творчих звершень, наснаги і сил на благо України.

Із повагою,

Президент НАН України, академік НАН України Б.Є. Патон

Колектив Фармакопейного центру одержав вітання від Міністерства охорони здоров'я України, Державного департаменту з контролю за якістю, безпекою та виробництвом лікарських засобів і виробів медичного призначення, Харківської обласної та районної адміністрації.

Із нагоди 10-річчя з дня утворення Фармакопейного центру співробітники ДП "Науково-експертний фармакопейний центр" за високий професіоналізм та багаторічну сумлінну працю були нагороджені відзнаками:

Почесною грамотою МОЗ України: Асмолова Н.М., Гризодуб О.І., Мальована О.О., Левін М.Г., Леонтьєв Д.А., Нестеренко Л.Л., Піотровська А.Г., Рудик З.С., Хованська Н.П., Чайка Л.О., Шунько М.Б.

Почесною грамотою Фармацевтичної Асоціації України: Боярська В.О., Гомон О.М., Долейко Н.В., Зінченко О.А., Коваленко А.І., Крупа Н.О., Кузнецова Т.В., Лагута О.П., Мартиненко Л.І., Матвієнко Т.М., Юдіна І.І.

Почесною грамотою Київської районної Ради м. Харкова: Бикова Л.Г., Георгієвський Г.В., Жемерова К.Г., Меркулова Ю.В., Носова Р.В., Терно І.С., Тихоненко Т.М., Товмасян Є.К., Саматов Р.С., Соґоян Т.П.

Фармакопейний комітет (нині Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр») Державного департаменту з контролю за якістю, безпекою та виробництвом лікарських засобів і виробів медичного призначення створений наказом Міністерства охорони здоров'я України від 19 березня 1992 р., № 50.

**Директор** - доктор фармацевтичних наук, професор, академік МІА, заслужений діяч науки і техніки України

**Георгієвський Віктор Петрович**

**Заступник з наукових питань** - доктор хімічних наук, професор, член Міжнародної Асоціації офіційних аналітичних хіміків

**Гризодуб Олександр Іванович**

**Заступник з фінансових питань –**

**Рудик Зухра Саламовна**

**Вчений секретар –**

**Піотровська Алла Григорівна**

Основні нормативні документи, що регулювали створення і первісну діяльність Фармакопейного комітету, були розроблені *В.П. Георгієвським, О.І. Гризодубом, А.Г. Піотровською, Н.П. Хованською і А.А. Литвиненко.*

#### **Основні завдання:**

- Забезпечення та підтримка високого рівня стандартів якості лікарських засобів за допомогою розробки нормативних документів зі стандартизації і науково-технічної експертизи аналітичної нормативної документації на лікарські засоби, що знаходяться на ринку України.

- Створення Державної Фармакопеї України.

- Створення національної системи фармакопейних стандартних зразків.

- Науково-методична робота з впровадження Державної Фармакопеї України і нормативних документів зі стандартизації лікарських засобів.

- Контроль якості лікарських засобів.

- Апробація методик контролю якості лікарських засобів при реєстрації їх в Україні.

- Експериментальний супровід розробки Державної Фармакопеї України.

#### **Основні структурні підрозділи:**

- **Відділ науково-технічної експертизи** (Завідувачка - А.Г. Піотровська);

- **Сектор науково-технічної експертизи** (Завідувачка - А.Г. Піотровська);

- **Сектор науково-технічної інформації і комп'ютеризації**

(Завідувачка - М.Б. Шунько);

- **Група обліку аналітичної нормативної документації (архів) з бібліотекою науково-технічної літератури**

(Завідувачка - Т.В. Кузнецова).

- **Відділ «Державна Фармакопея України»**

(Завідувач - М.Г. Левін, доктор хімічних наук, дійсний член Британського Хімічного Королівського товариства);

- **Група "Загальні статті та методи аналізу"** (керівник - М.Г. Левін, доктор хімічних наук, дійсний член Британського Хімічного Королівського товариства; старший науковий співробітник групи – І.С. Терно, кандидат хімічних наук);

- **Група "Монографії на лікарські субстанції"**

(керівник – Г.В. Георгієвський, кандидат фармацевтичних наук; старший науковий співробітник групи – Є.К. Товмасян, кандидат біологічних наук);

- **Група "Загальні статті на лікарські форми і фармако-технологічні випробування"** (керівник – Н.М. Асмолова, кандидат фармацевтичних наук);

- **Група "Валідація методик, стандартні зразки та метрологія"**

(керівник – Д.А. Леонт'єв, кандидат фармацевтичних наук);

- **напрямок "Лінгвістична підтримка створення Державної Фармакопеї України**

(керівник – старший науковий співробітник Л.Г. Бикова, кандидат філологічних наук, доцент).

- **Лабораторія фармакопейного аналізу** (Завідувачка - Н.П.Хованська, кандидат фармацевтичних наук):

- **Група фізико-хімічних методів аналізу** (керівник – Н.П.Хованська);

- **Група біологічних методів аналізу** (керівник – Л.О. Чайка, кандидат медичних наук);

- **Група мікробіологічних методів аналізу** (керівник – К.Г. Жемерова).

- **Фінансово-економічний відділ** (Завідувачка - З.С. Рудик).

- **Типографія** (Завідувач – Р.С. Саматов).

**Робочі експертні органи - Бюро Науково-експертного Фармакопейного центру і 7 експертних спеціалізованих комісій:**

- Спеціалізована експертна хімічна комісія (голова - Болотов В.В., доктор хімічних наук, професор; науково-технічні секретарі - головний фахівець Юдіна І.І., інженер I категорії Чикалова С.О.).

- Спеціалізована експертна фармацевтична комісія із правом розгляду антибіотиків і вітамінів (фармацевтична комісія-1) (голова - Левін М.Г., доктор хімічних наук, дійсний член Британського Хімічного Королівського товариства; науково-технічні секретарі – головний фахівець Крупа Н.О., інженер I категорії Рибаченко І.В.).

- Спеціалізована експертна фармацевтична комісія із правом розгляду антибіотиків і вітамінів (фармацевтична комісія-2) (голова - Н.М. Скаун, кандидат фармацевтичних наук; науково-технічний секретар – інженер I категорії Білоусова О.С.).

- Спеціалізована експертна фармацевтична комісія із правом розгляду антибіотиків, ферментів і органопрепаратів (фармацевтична комісія-3) (голова - Воробйов М.Є., кандидат фармацевтичних наук; науково-технічні секретарі – головний фахівець Матвієнко Т.М., вед. інженер Тихоненко Т.М.).

- Спеціалізована експертна фармацевтична комісія з правом розгляду сорбентів і кровозамінників (фармацевтична комісія-4) (голова – Оридорога В.О., доктор фармацевтичних наук; науково-технічний секретар – головний науковий співробітник Литвиненко А.Л.).

- Спеціалізована експертна фітохімічна комісія (голова - Рибаченко А.І., кандидат хімічних наук; науково-технічний секретар – інженер I категорії Боярська В.О.).

- Спеціалізована експертна комісія з питань упаковки і маркування (голова - Сухінін В.М., кандидат фармацевтичних наук; науково-технічний секретар – головний фахівець Коваленко А.І.).

**Основні підсумки діяльності:**

1. Вперше в Україні створена національна система аналітичної нормативної документації лікарських засобів. В основу системи покладені розроблені Фармакопейним комітетом МОЗ України Методичні вказівки «Індивідуальні лікарські речовини і готові лікарські засоби. Основні показники якості і методи контролю, що включаються в аналітичну нормативну документацію» (МВ ФК-1-96).

2. Розроблена і в 2001 році введена в дію перша в історії незалежної України Державна Фармакопея. Державна Фармакопея України - перша національна фармакопея серед країн СНД.

3. Із 1998 року Україна, в особі Науково-експертного фармакопейного центру, єдина з країн СНД, отримала статус спостерігача в Європейській Фармакопеї. Це дає можливість володіти новітньою інформацією стосовно вимог до якості лікарських засобів в Європейському Співтоваристві.

4. Одночасно зі створенням Фармакопейного комітету у 1992 році створена перша в Україні лабораторія з контролю якості лікарських засобів - Лабораторія фармакопейного аналізу. Лабораторія, яка була на початковому етапі єдиною в Україні, надала суттєву допомогу Державній інспекції з контролю якості лікарських засобів у встановленні національної системи державного контролю за якістю лікарських засобів. На даний час Лабораторія є уповноваженою МОЗ на проведення передреєстраційних досліджень, отримала Атестати акредитації Держстандарту України та Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України.

5. Створена національна система фармакопейних стандартних зразків. Розроблена і впроваджується на підприємствах фармацевтичної галузі система робочих стандартних зразків.

6. Науково-експертний фармакопейний центр є одним з авторів «Угоди про співробітництво в галузі стандартизації, реєстрації і контролю якості лікарських засобів, виробів медичного призначення і медичної техніки, держав-учасників СНД» (1993 р.) і багатьох її подальших Протоколів. Це дозволило створи-

ти нормативну базу зі стандартизації для товарообігу лікарських засобів в СНД.

7. Вперше в СНД:

- Введена (із 1993 року) загальноприйнята світова практика взаємозв'язку аналітичної і технологічної-нормативної документації.

- Введена (із 1995 року) загальноприйнята світова практика затвердження аналітичної нормативної документації на конкретно-го виробника.

- Розроблена і введена в дію (із 1993 року) система контролю якості і широкого використання імпортованих субстанцій для виготовлення лікарських засобів.

- Розроблено і введено в практику метод контролю бактеріальних ендотоксинів в парентеральних препаратах.

- Спільно з Фармакологічним комітетом МОЗ України та Державною інспекцією з контролю якості лікарських засобів МОЗ України, розроблена і введена в дію (із 1995 року) система створення препаратів «генерікс», що дозволило протягом тільки перших 2 років впровадити в Україні понад 100 препаратів.

8. Спільно з Державним Фармакопейним комітетом Російської Федерації розроблені МВ СНД 42-01-97 «Індивідуальні лікарські речовини і готові лікарські засоби. Основні показники якості і методи контролю, що включаються в аналітичну нормативну документацію», які в цей час прийняті як обов'язкові в країнах СНД.

9. Експертні роботи:

- Проведено більше 1000 засідань спеціалізованих експертних комісій Науково-експертного фармакопейного центру.

- Розглянуто близько 7500 аналітичних нормативних документів на лікарські засоби та змін до них (із них 1841 на зарубіжні).

- Затверджено 1234 фармакопейні статті.

- Затверджено 1747 тимчасових фармакопейних статей.

- Затверджено 728 зміни до нормативних документів (із них 58 до нормативних документів зарубіжних виробників).

- За направленням Державного фармакологічного центру МОЗ України проведена експертиза матеріалів II частини реєстраційного досяє на 108 препаратів (з них 27 зарубіжного виробництва).

- Видано 1928 дозволів з упаковки та маркування до діючих нормативних документів.

- Рекомендовано до реєстрації 1609 препаратів зарубіжного виробництва.

- На доопрацюванні знаходиться близько 110 аналітичних нормативних документа.

- Проконтрольовано 1340 серій імпортованих субстанцій на відповідність вимогам фармакопейних статей та вимогам додаткових тестів на залишкові органічні розчинники та мікробіологічну чистоту, 131 з яких було забраковано;

- Видано висновків щодо якості 1928 перших промислових серій готових лікарських засобів (біля 390 найменувань).

- Проведено передреєстраційні дослідження 587 зарубіжних препаратів та апробацію методик на стадії реєстрації 94 вітчизняних препаратів;

- Надана експериментальна допомога виробникам лікарських засобів із розробки та контролю якості по окремих показниках (262 серії).

10. Проведено понад 15 тематичних семінарів з питань стандартизації, методів контролю якості лікарських засобів, а також впровадження Державної Фармакопеї України.

#### Перспективні плани:

- Розробка і видання щорічних Доповнень до Державної Фармакопеї України.

- Вхідження України до Європейської Фармакопеї в статусі повноправного члена.

- Участь у розробці Фармакопеї СНД.

- Підвищення рівня вимог до якості лікарських засобів шляхом впровадження вимог Державної Фармакопеї України в аналітичну нормативну документацію на лікарські засоби.

- Підвищення рівня науково-технічної експертизи матеріалів II частини реєстраційного досяє, яка проводиться Науково-експертним фармакопейним центром, шляхом подальшого розвитку і впровадження системи стандартизації лікарських засобів відповідно до стандартів Європейського Співтовариства.

- Участь у розробці настанов щодо вимог до змісту матеріалів II частини реєстраційного досяє на лікарський засіб, що подається на реєстрацію в Україні, із урахуванням вимог Європейського Співтовариства.

- Атестація субстанцій різних виробників на відповідність Державній Фармакопеї України.

- Широке впровадження валідації при експертизі аналітичних нормативних документів.

- Подальший розвиток системи фармакопейних стандартних зразків України, а також

створення фармакопейних стандартних зразків в США.

- Науково-методична робота з подальшого впровадження вимог Державної Фармакопеї України та її щорічних Доповнень, а також з питань стандартизації лікарських засобів.
- Проведення досліджень та розробка методів аналізу лікарських засобів, участь у програмах національних та міжнародних міжлабораторних досліджень.

За 10 років існування Науково-експертний фармакопейний центр розвинувся в велику, добре оснащену і структуровану організацію, спроможну:

- виконувати експертні роботи на високому науковому рівні з урахуванням вимог стандартів Європейського Співтовариства;
- розробляти Державну Фармакопею України і США;
- проводити апробацію методик і контроль за повним обсягом показників аналітичної нормативної документації;
- атестувати і впроваджувати стандартні зразки;
- вирішувати численні проблеми розробки, валідації і метрологічного забезпечення аналітичних методик;
- виконувати роботи по розвитку стандартизації в галузі.

На адресу ДП «Науково-експертний фармакопейний центр» продовжують надходити привітання із виданням Державної Фармакопеї України

Від американських колег колектив Фармакопейного центру поздоровив д-р Джером А. Гальперін

Шановний доктор Георгієвський!

Поздоровляю з виданням Державної Фармакопеї України. Кілька років тому Фармакопея України була лише мрією, тепер це реальність. Вважаю, що створення Фармакопеї України буде сприяти інтеграції України до Європейського співтовариства.

Це значне досягнення за дуже короткий час, бо від часу організації Фармакопейного комітету до створення Державної Фармакопеї України пройшло лише 10 років.

Які Ваші плани щодо публікації Доповнень до Фармакопеї? Для того, щоб отримати визнання і бути прийнятою іншими національними Фармакопеями країн Європи та Європейською Фармакопесю, Фармакопея України повинна мати офіційний та передбачуваний цикл перегляду. Крім того, важливо друкувати видання, подібне Фармакопейному Форуму (Pharmacopeial Forum).

На жаль, я зміг прочитати лише назви лікарських засобів англійською мовою, але зрозуміло, що Фармакопея побудована раціонально, і я гадаю, що розділи документа містять методи випробувань й аналізу. Сподіваюсь, що перше переглянуте видання буде мати більший об'єм за рахунок інших монографій та методів аналізу.

Ви та Ваші колеги по Фармакопейному центру можуть пишатися цим значним досягненням. Я дуже задоволений тим, що Фармакопея США змогла надати допомогу у Вашій роботі.

Прийміть мої щирі побажання подальших успіхів.

Джером А. Гальперін

**Доктор Джером А. Гальперін** від 1989 року до 2000 року був Виконавчим віце-президентом Фармакопейної Конвенції США. Під його керівництвом Фармакопея США стала однією із впливовіших Фармакопей у світі.

Зараз доктор Гальперін є Президентом і Виконавчим директором Інституту законодавства в галузі лікарських засобів та продуктів харчування (US Food and Drug Law Institute).

**23 июня 2002 года исполнилось 65 лет известному ученому и организатору в области фармации, Заслуженному деятелю науки и техники Украины, академику Международной инженерной академии, доктору фармацевтических наук, профессору**

### **Виктору Петровичу Георгиевскому**



С 1958 года и по настоящее время Виктор Петрович работает в Государственном научном центре лекарственных средств, пройдя путь от лаборанта, младшего (1960) и старшего научного сотрудника (1965), заведующего лабораторией (1971) до заведующего отделом изучения качества лекарственных препаратов (1978). В 1989 году коллектив ГНЦЛС избрал В.П. Георгиевского директором Центра.

С 1992 года В.П. Георгиевский возглавляет также Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр» (ранее — Фармакопейный комитет).

В.П. Георгиевский - один из основателей и главный редактор научно-практического журнала «Фармаком».

Научно-практическая деятельность В.П. Георгиевского многогранна — это известный ученый, крупный организатор науки и общественный деятель.

В его творческой деятельности можно выделить следующие научные направления:

- разработка фундаментальных вопросов фармацевтического анализа;

- разработка вопросов аналитического обеспечения технологических исследований по созданию лекарственных средств;

- разработка общей концепции создания лекарственных средств;

- стандартизация лекарственных средств.

В.П. Георгиевским была сформирована крупнейшая в Украине и СНГ школа фармацевтического анализа, которая под его руководством приступила к решению фундаментальных вопросов практически по всем его направлениям. Среди воспитанников этой школы такие известные специалисты как А.И. Гризодуб, М.Г. Левин, Ю.В. Поддружинов и др.

Выполненные под руководством В.П. Георгиевского исследования в области оптимизации условий хроматографирования в жидкостной хроматографии с многокомпонентными подвижными фазами позволили ГНЦЛС занять ведущее место в Украине и СНГ в области высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) лекарственных средств и широко применить ее в фармацевтическом анализе. Первая фармакопейная статья в бывшем СССР, использующая ВЭЖХ для контроля качества лекарственного средства (ФС 42-2043-91 «Конваллятоксин-стандарт»), была разработана в ГНЦЛС под руководством В.П. Георгиевского. Практически все аналитические нормативные документы (АНД) в Украине, контролирующее качество лекарственных средств методом ВЭЖХ, разработаны в ГНЦЛС школой В.П. Георгиевского.

Впервые в отечественном фармацевтическом анализе школой В.П. Георгиевского сформулировано понятие «аналитическое обеспечение технологических исследований по созданию лекарственного средства», что способствовало созданию новой концепции создания лекарственных средств. Особенно значительный эффект она дает при разработке препаратов-генериков. В сочетании с разработанными под руководством В.П. Георгиевского новыми принципами стандартизации



лекарственных средств новая концепция позволила резко (в 5-10 раз) сократить сроки создания препаратов-генериков. Именно благодаря ей в 1992-2002 гг. ГНЦАС созданы 55 новых препаратов и более 150 препаратов-генериков.

Разработанная под руководством В.П. Георгиевского отечественная система стандартизации лекарственных средств, учитывающая национальные особенности Украины, позволила за 5 лет существенно повысить требования к качеству отечественных препаратов. Свидетельством этого является достаточно высокий авторитет украинских препаратов на фармацевтическом рынке СНГ.

В.П. Георгиевский — Председатель Бюро Редакционной коллегии Государственной Фармакопеи Украины. Под его руководством разработана и в 2001 году введена в действие первая в истории независимой Украины Государственная Фармакопея. Государственная Фармакопея Украины — первая национальная фармакопея среди стран СНГ.

Многогранная творческая деятельность В.П. Георгиевского нашла отражение в 346 научных публикациях, 87 охранных документах, 7 монографиях и 199 аналитических нормативных документах на лекарственные средства (ВФС и ФС). Под его научным руководством защищено 11 кандидатских и 3 докторских диссертации.

В.П. Георгиевский — крупный организатор науки. Под его руководством ГНЦАС превратился в крупнейший центр фармацевтической науки в СНГ, с участием которого разрабатывается большинство лекарственных средств в Украине. Особенно сильны позиции ГНЦАС в технологии, стандартизации

и контроле качества лекарственных средств, где он является Головной организацией и осуществляет научное руководство фармацевтической промышленностью Украины.

В.П. Георгиевский награжден орденом Украины «За заслуги» III степени и II степени, орденом Святого Дмитрия Солунского IV степени, медалями и Почетными грамотами.

В.П. Георгиевский — председатель специализированного Ученого совета при ГНЦАС по защите диссертаций на соискание ученого звания доктора фармацевтических наук. Он является также членом Правления Ассоциации хроматографистов Украины, членом редколлегии многих журналов.

Виктор Петрович известен не только как крупный ученый и организатор, но и как человек разносторонних увлечений и способностей.

В.П. Георгиевский один из тех ученых, которые оказывали и оказывают значительное влияние на развитие фармацевтической науки и производства в Украине. Наблюдающийся в последние годы подъем фармацевтической промышленности в Украине в немалой степени связан и с реализацией его научных концепций.

Коллектив Государственного научного центра лекарственных средств, Ученый совет ГНЦАС, коллектив ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», редакция журнала «Фармаком», многочисленные ученики и последователи Виктора Петровича Георгиевского поздравляют его с юбилеем и желают крепкого здоровья, удачи во всех делах, научных достижений, внедрений новых разработок и достойных учеников!

ВИТЯГ З УКАЗУ  
ПРЕЗИДЕНТА УКРАЇНИ  
ПРО ВІДЗНАЧЕННЯ ДЕРЖАВНИМИ НАГОРОДАМИ УКРАЇНИ  
МЕДИЧНИХ ПРАЦІВНИКІВ

За вагомий особистий внесок у розвиток охорони здоров'я, високий професіоналізм **постановляю:**

**Нагородити орденом "За заслуги" II ступеня**

ГЕОРГІЄВСЬКОГО Віктора Петровича — директора Державного наукового центру лікарських засобів, м. Харків

**Президент України**

М. Київ, 13 червня 2002 року

№ 553/2002

**Л. Кучма**

---

**Журналу «ФАРМАКОМ» – 10 років**

---

**Шановні автори та читачі журналу “Фармаком”!**

**У серпні 2002 року нашому журналу виповнилося 10 років**

Журнал “Фармаком” був заснований у 1992 році ДНЦЛЗ та Фармакопейним комітетом України (нині ДП “Науково-експертний фармакопейний центр”).

Перший номер журналу “Фармаком” вийшов друком у серпні 1992 року.

Беззмінним головним редактором журналу є професор, доктор фарм. наук, засл. діяч науки і техніки України Георгієвський Віктор Петрович.

Серед членів редакційної колегії журналу – провідні науковці в галузі фармації, хімії та медицини України.

Тривалий час завідувачем науково-видавничим відділом – редакцією журналу був Болдирев К.К.

Наукове редагування здійснювали доктор фарм. наук, професор Прокопенко О.П.; доктор фарм. наук, професор Батюк В.С.; канд. мед. наук Васильченко Є.О.

Завжди у центрі нашої уваги конференції, конгреси, семінари, присвячені проблемам фармації та охорони здоров'я.

За 10 років існування побачили світ 69 випусків журналу, у яких було надруковано більше як 650 публікацій, у тому числі близько 480 наукових статей.

Співробітникам редакції приємно усвідомлювати, що у захисті кандидатських та докторських дисертацій нашими авторами є частинка і праці редакції журналу.

Протягом останніх років провідною темою журналу є освітлення розробки Державної Фармакопеї України (ДФУ) та її Доповнення, а також публікація матеріалів, що сприяють впровадженню вимог ДФУ.

З жовтня 2001 року журнал “Фармаком” виходить в електронній версії. В Інтернет ми маємо вже понад 3 тис читачів із різних регіонів України, близького та далекого зарубіжжя.

Щиро вітаємо наших авторів, бажаємо їм нових наукових злетів і сподіваємося на плідне співробітництво.

Дякуємо читачам журналу за постійну увагу до нашої праці.

Виражаємо щире подяку всім, хто протягом 10 років редагував, коректував та видавав журнал “Фармаком”.

Будемо і надалі активно працювати в ім'я розвитку фармацевтичної галузі України, зміцнення її наукового потенціалу та охорони здоров'я українського народу.

*Редакція журналу*

## У ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»

УДК 615.454

Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Терно И.С., Котов А.Г.

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

### **Фармакопейные методы вискозиметрии при фармацевтической разработке, производстве и контроле качества жидких и мягких лекарственных средств**

Материалы информационно-консультативного семинара «Особенности выполнения фармако-технологических испытаний Государственной Фармакопеи Украины», Харьков, 24-26 апреля 2002 года

Разработаны общие статьи Государственной Фармакопеи Украины 2.2.8 «В'язкість», 2.2.9 «Метод капілярної вискозиметрії» и 2.2.10 «Метод ротаційної вискозиметрії». Проведен сравнительный анализ указанных общих статей с соответствующими статьями Европейской Фармакопеи 4 изд., Государственной Фармакопеи СССР XI изд. и Фармакопеи США 24 изд. Показано значение исследования вязкости и других реологических параметров при разработке, валидации технологического процесса, производственном контроле и контроле качества жидких и мягких лекарственных средств. Приведены некоторые результаты исследований вязкости и на этих примерах показаны критические аспекты состава и технологии, требующие применения фармакопейных методов вискозиметрии на этапах фармацевтической разработки, стандартизации, масштабирования процесса и серийного производства этих лекарственных форм.

Вязкость — одно из самых характерных свойств веществ и систем, которым присуще жидкое состояние. Вискозиметрия относится к числу наиболее чувствительных методов физико-химического анализа. Этот метод позволяет фиксировать не только слабые взаимодействия в жидких системах, но и определять стехиометрию этих взаимодействий [1]. Коэффициенты вязкости и их температурные производные очень чувствительны к ассоциативному состоянию вещества и межчастичным взаимодействиям в растворителях, растворах и дисперсных системах. Это позволяет рассматривать вискозиметрию как один из наиболее информативных и чувствительных методов физико-химического анализа и контроля качества жидких материалов [2,3].

Вискозиметрия — наиболее простой и доступный метод определения молекулярной массы полимеров [4]. Коэффициенты вязкости являются константами, характеризующими подлинность и чистоту растворителей и растворов, и входят в справочники физико-химических свойств [4,5]. Исследование вязкости повсеместно используется как в научных целях, так и для контроля качества.

Учитывая вышеизложенное, были разработаны и включены в Государственную Фармакопею Украины (ГФУ) три общие статьи: 2.2.8 «В'язкість», 2.2.9 «Метод капілярної вискозиметрії» и 2.2.10 «Метод ротаційної вискозиметрії».

Цель данной публикации — сравнить указанные общие статьи с соответствующими статьями Европейской Фармакопеи 4 изд. (ЕФ, 2002), Государственной Фармакопеи СССР XI изд. (ГФ XI) и Фармакопеи США 24 (USP, 24), а также показать значение исследования вязкости и других реологических параметров при фармацевтической разработке, валидации технологического процесса, производственном контроле и контроле качества жидких и мягких лекарственных средств.

#### *Объекты и методы исследований*

Объектами сравнительного анализа служили общие статьи ГФУ 2.2.8 «В'язкість», 2.2.9 «Метод капілярної вискозиметрії» и 2.2.10 «Метод ротаційної вискозиметрії» [7]; общие статьи ЕФ 2.2.8 «Viscosity», 2.2.9 «Capillary Viscometer Method» и 2.2.10 «Rotating Viscometer Method» [8]; а также общая статья ГФ XI «Определение вязкости жидкостей» [9] и статья USP 24 <911> «Viscosity» [10].

Объекты реологических исследований указаны в тексте статьи при описании результатов эксперимента. Кинематическую и динамическую вязкость ньютоновских жидкостей измеряли на вискозиметрах Уббелоде или Оствальда; реологические исследования мягких лекарственных средств проводили на ротационном вискозиметре с коаксиальными цилиндрами «REOTEST-2» (Германия) или на реовискозиметре «POLYVISC» (Швейцария).

**Результаты и их обсуждение**

При разработке указанных общих статей ГФУ руководствовались стратегией гармонизации национальной Фармакопеи Украины с ЕФ. Поэтому основой для статей ГФУ стали статьи ЕФ 2.2.8 «Viscosity» («Вязкость»), 2.2.9 «Capillary Viscometer Method» («Метод капиллярной вискозиметрии»), 2.2.10 «Rotating Viscometer Method» («Метод ротационной вискозиметрии») [8]. Следует отметить, что указанные статьи ЕФ, 1997 и ЕФ, 2002 идентичны. Статьи ЕФ дают четкую, но ограниченную информацию о вязкости и предполагают ее измерение только на двух видах вискозиметров: капиллярном вискозиметре Уббелюде и ротационном вискозиметре с двумя вращающимися коаксиальными цилиндрами. Современный уровень технического оснащения контрольно-аналитических и исследовательских лабораторий в Украине не позволяет выполнять в полной мере требования ЕФ в отношении используемых вискозиметров. Поскольку статья ЕФ 2.2.8 допускает использование и других вискозиметров при условии, что точность и правильность измерений будут не хуже, чем в случае описанных вискозиметров, описанных в ЕФ, по этому вопросу были проанализированы соответствующие статьи USP, 24 и ГФ XI.

В статье USP, 24 <911> «Viscosity» допускается использование, наряду с капиллярными вискозиметрами Уббелюде, вискозиметров Оствальда, а также ревискозиметров различных модификаций [10].

В соответствии с ГФ XI для определения вязкости методом капиллярной вискозиметрии следует использовать вискозиметры по ГОСТ 10028-81 различных марок, существенно отличающиеся по конструкции и точности. Поэтому национальная часть статьи 2.2.9 ГФУ допускает использование дополнительно только одной марки капиллярного вискозиметра ВПЖ-1 по ГОСТ 10028-81. Конструкция и параметры вискозиметров этой марки наиболее близки к вискозиметру, описанному в ЕФ и рекомендованному Международной организацией по стандартизации (Рис. 1 и 2, Табл. 1 и 2).

В соответствии со статьей 2.2.10 ЕФ определение вязкости методом ротационной вискозиметрии следует проводить на реовискозиметрах с двумя вращающимися коаксиальными цилиндрами. Как и в USP, 24, в национальной части статьи 2.2.10 допускается также использовать ротационные вискозиметры

с коаксиальными цилиндрами, у которых вращается только один внутренний цилиндр. К ним относятся широко используемые в Украине реовискозиметры типа «Reotest-2», «VISCOSTAR», «POLYVISC», «BROOKFIELD» и др.

Рисунок 1

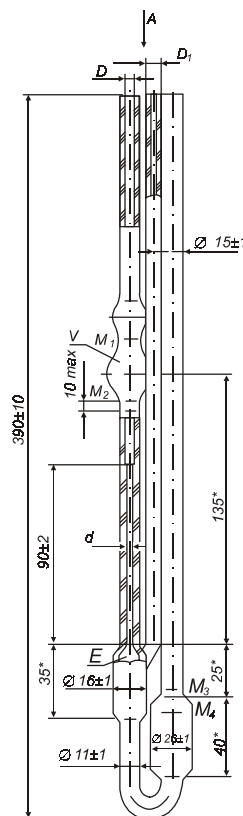
**Вискозиметр капиллярный стеклянный типа ВПЖ-1**

Рисунок 2

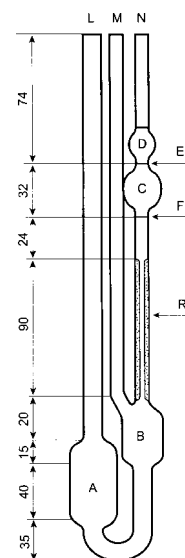
**Вискозиметр с висячим уровнем, рекомендованный ЕФ**

Таблица 1

**Характеристики капиллярного вискозиметра с висячим уровнем по ЕФ**

Размер	Номинальная постоянная вискозиметра	Диапазон кинематической вязкости	Внутренний диаметр трубки, R	Объем расширения, C	Внутренний диаметр трубки, N
	мм <sup>2</sup> · с <sup>-2</sup>	мм <sup>2</sup> · с <sup>-1</sup>	мм (± 2%)	мл (± 5%)	мм
1	0.01	3.5-10	0.64	5.6	2.8-3.2
1A	0.03	6-30	0.84	5.6	2.8-3.2
2	0.1	20-100	1.15	5.6	2.8-3.2
2A	0.3	60-300	1.51	5.6	2.8-3.2
3	1.0	200- 1000	2.06	5.6	3.7-4.3
3A	3.0	600 – 3000	2.74	5.6	4.6-5.4
4	10	2000- 10000	3.70	5.6	4.6-5.4
4A	30	6000 - 30 000	4.07	5.6	5.6-6.4
5	100	20000-100000	6.76	5.6	6.8-7.5

Таблица 2

**Характеристики вискозиметра капиллярного стеклянного типа ВПЖ-1**

Номинальное значение постоянной K, мм <sup>2</sup> /с <sup>2</sup>	Диапазон измерения вязкости, мм <sup>2</sup> /с <sup>2</sup>	d (номинальное значение)	D ±0.2	D <sub>1</sub> ±1.0	Объем измерительного резервуара, V, см <sup>3</sup>
0.003	От 0.6 до 3	0.34	2.50	7.0	1.5±0.2
0.01	От 2 до 10	0.54			3.0±0.3
0.03	От 6 до 30	0.86	4.00		6.2±0.3
0.1	От 20 до 100	1.16			
0.3	От 60 до 300	1.52			
1	От 200 до 1000	2.10			
3	От 600 до 3000	2.75			
10	От 2 000 до 10 000	3.75	5.00	8.0	
30	От 6 000 до 30 000	5.10	5.50		
100	От 20 000 до 100 000	6.85	6.85		

Измерение вязкости на вискозиметре с падающим шариком не было включено в ГФУ, поскольку этот метод не включен в ЕФ и USP, 24. Математическая теория для определения структурной вязкости с помощью вискозиметров с падающим шариком не разработана, и они пригодны для измерения вязкости только ньютоновских жидкостей. В отличие от капиллярной вискозиметрии в методе падающего шарика распределение скоростей в потоке нелинейно, оно соответствует неоднородному сдвигу и нестационарному потоку, что снижает достоверность полученных результатов [4]. Для определения вязкости ньютоновских жидкостей более предпочтителен метод капиллярной вискозиметрии в связи с его простотой и большей точностью [4,11].

Ошибки различных методов вискозиметрии, а также ограничение применения различных типов вискозиметров описаны в ли-

тературе [4,11]. Корректно поставленный эксперимент по определению вязкости жидкостей методом капиллярной вискозиметрии позволяет получать результаты с погрешностью 0.02 %. Вязкость очень сильно зависит от температуры; при поддержании температуры с точностью 0.005 К неопределенность в значении вязкости для жидкостей составляет величину порядка 0.002-0.004 % [4]. Очень важно измерять вязкость жидкостей при термостатировании с точностью, по крайней мере, ±0.1 °С. Неточность поддержания температуры существенно влияет на вязкость. Погрешности могут возникать от неточности поддержания температуры в элементе объема термостата и существования градиента температур по его объему. Если не указано иначе в частных статьях, для стандартизации лекарственного препарата вязкость следует определять при температуре (20±0.1) °С.

Статья 2.2.8 ЕФ дает определение только динамической и кинематической вязкости, хотя предполагает определение вязкости как ньютоновских, так и неньютоновских жидкостей. В связи с этим в национальной части статьи 2.2.8 ГФУ была дополнительно приведена информация о типах течения систем и дано определение структурной (эффективной или кажущейся) вязкости. Кроме того, как и в ГФ XI, приведена информация об относительной, удельной, приведенной и характеристической вязкостях, которые используются в аналитической нормативной документации для стандартизации реологических свойств различных лекарственных форм. Так, например, характеристической вязкостью пользуются для расчета среднего значения молекулярных масс некоторых полимеров (в частности, поливинилпирролидона, используемого в препаратах «Гемодез», «Неогемодез», «Глюкогемодез» и др.), а структурную вязкость определяют при стандартизации мягких и жидких лекарственных средств. Определение этих видов вязкости также может быть рационально при проведении научных исследований.

Таким образом, национальные требования статей 2.2.8, 2.2.9 и 2.2.10 ГФУ учитывают специфику определения реологических свойств препаратов в отечественной науке и фармацевтическом анализе в соответствии с современными тенденциями.

Далее приведены некоторые примеры того, как путем измерения вязкости можно решить проблемы на этапах фармацевтической разработки, валидации процесса, производственного контроля и контроля качества жидких и мягких лекарственных средств.

Состав смешанных растворителей определяет их структуру. В Табл. 3 представлены результаты исследования вязкости тройной системы, состоящей из воды, пропиленгликоля (ПГ) и полиэтиленоксида 400 (ПЭО-400) (при массовом соотношении ПГ и ПЭО-400 6:4) в зависимости от состава и температуры.

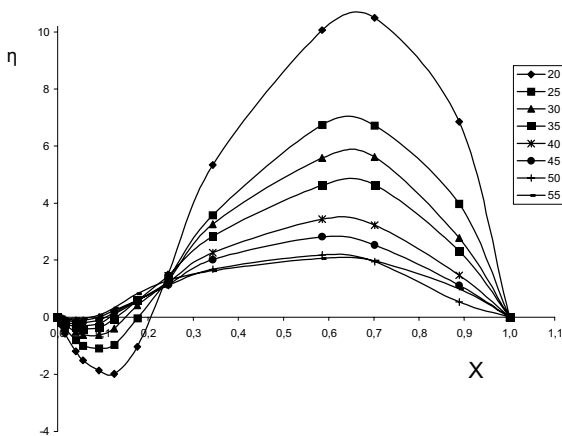
Как видно из Табл. 3, вязкость исследуемых систем меняется в широких пределах как с изменением состава, так и температуры. Изотермы вязкости всех изученных растворов нелинейны, что характерно для систем, не подчиняющихся закону Рауля. Отклонения экспериментальных величин вязкости от аддитивных значений указывают на наличие разной степени межчастичного взаимодействия в изученных системах. Изотермы отклонений носят S-образный характер и несимметричны (Рис. 3). Такие изотермы реализуются в тех системах, компоненты которых значительно отличаются по вязкости, а количество образующегося продукта ассоциации низкомолекулярного и высокомолекулярного растворителя недостаточно, чтобы превысить вязкость более вязкого компонента [1].

Таблица 3

**Вязкость тройной системы вода – пропиленгликоль – ПЭО-400**

Доля в смеси ПГ и ПЭО		Динамическая вязкость, мПа·с							
Масс.	Мол.	20 °С	25 °С	30 °С	35 °С	40 °С	45 °С	50 °С	55 °С
0.00	0.000	1.005	0.8937	0.8007	0.7225	0.656	0.5988	0.5494	0.5064
4.74	0.008	1.2112	1.0639	0.9459	0.8335	0.7681	0.6962	0.6285	0.5768
9.48	0.016	1.4351	1.2525	1.1079	0.9725	0.8774	0.7907	0.7160	0.6482
20.76	0.040	2.2804	1.9450	1.7042	1.4864	1.3086	1.1568	1.0293	0.9310
27.35	0.057	2.9837	2.5073	2.1718	1.8810	1.6381	1.4390	1.2750	1.1351
38.72	0.092	4.7852	4.0400	3.4162	2.9017	2.4895	2.1617	1.8909	1.6581
47.29	0.126	7.0297	5.8266	4.8458	4.1350	3.5703	2.9701	2.5628	2.3124
57.31	0.177	10.9128	9.0593	7.4979	6.2203	5.2134	4.4114	3.7309	3.4238
66.98	0.245	17.7403	13.6664	10.8290	9.0069	7.4309	6.2061	5.2556	4.6960
76.56	0.343	27.8258	20.5696	16.3789	13.1845	10.7435	8.9149	7.2991	6.2329
89.83	0.586	48.3720	35.5697	27.7246	22.0301	17.6447	14.3242	11.5059	9.6566
93.63	0.702	56.5795	41.3533	32.1942	25.5029	20.2372	16.2918	13.0851	11.0319
98.00	0.887	65.6244	48.0737	36.5787	28.8140	23.0440	18.5484	14.6265	12.4288
100.00	1.000	66.6446	50.3349	38.6192	30.2549	24.0591	19.3644	15.2108	13.1224

Рисунок 3



**Концентрационные зависимости отклонений вязкости тройной системы вода – ПГ – ПЭО-400 от аддитивных значений при разных температурах**

$\eta$  – динамическая вязкость, мПа·с;  
 $X$  – мольная доля смеси ПГ и ПЭО-400 в масс. соотношении 6:4).

Политермические исследования вязкости смешанных растворителей позволяют рассчитать квазитермодинамические характеристики активации вязкого течения: свободную энергию активации вязкого течения  $\Delta G_{\eta}^{\ddagger}$  по уравнению Эйринга [12], энтропию активации  $\Delta S_{\eta}^{\ddagger}$  дифференцированием свободной энергии активации вязкого течения по температуре, а также энтальпию активации  $\Delta H_{\eta}^{\ddagger}$ , исходя из общего термодинамического уравнения:

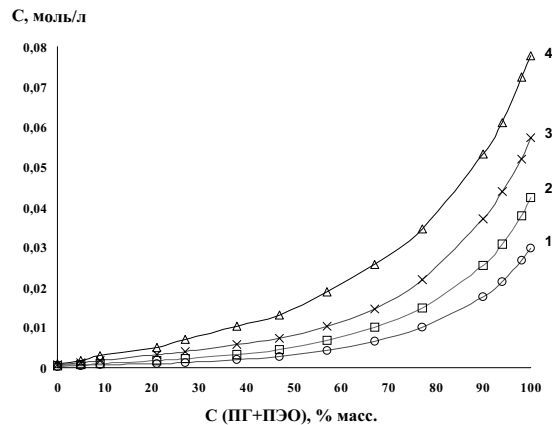
$$\Delta G_{\eta}^{\ddagger} = \Delta H_{\eta}^{\ddagger} - T \cdot \Delta S_{\eta}^{\ddagger}$$

Исходя из этих данных, можно судить о структуре смешанного растворителя или раствора в зависимости от состава, и соотносить ее с другими физико-химическими свойствами. Однако даже на основании одних изотерм вязкости (Рис. 3) можно выделить четыре области составов тройных растворителей:

- 1) растворители, в которых преобладает структура воды (от 73 до 100 % масс. воды);
- 2) растворители со смешанной структурой с преобладанием структуры воды (содержат от 61 до 38 % масс. воды);
- 3) растворители со смешанной структурой с преобладанием структуры неводного растворителя (содержат от 8 до 38 % масс. воды);
- 4) растворители, в которых преобладает структура неводного растворителя (содержат до 7-8 % масс. воды).

Как показали наши исследования, в зависимости от структуры (и соответственно концентрации воды) требуются разные факторы физической стабилизации дисперсных систем. Так, водорастворимые мазевые основы при содержании воды 7-8 % становятся ньютоновскими жидкостями [13], при содержании воды более 38 % происходит разрушение коагуляционных структур, образованных комплексными эмульгаторами, состоящими из эмульгатора 1 рода и высших жирных спиртов [14], при превалировании структуры неводного растворителя резко возрастает растворимость гидрофобных веществ, в частности, миконазола нитрата (Рис. 4).

Рисунок 4



**Зависимость растворимости (C, моль/л) миконазола нитрата в трехкомпонентной системе вода/пропиленгликоль/ПЭО-400 от концентрации (C, % масс.) неводных растворителей при температурах: 1 – 20 °С; 2 – 30 °С; 3 – 40 °С; 4 – 50 °С.**

Таким образом, исследование вязкости может способствовать выбору рационального состава жидких и мягких лекарственных средств и прогнозированию их физико-химических свойств в процессе хранения.

В общей статье «М'які лікарські засоби для місцевого застосування» ГФУ указано, что мягкие лекарственные средства (МЛС) характеризуются специфическими реологическими свойствами при установленной температуре хранения: неньютоновским типом течения, определенной структурной вязкостью, псевдопластическими или пластическими и тиксотропными свойствами [7]. ЕФ также характеризует реологические свойства мазей, кремов и гелей как вязкоэластичные с неньютоновским типом течения, например, пластическим, псевдопластическим или тиксотропным типом течения при высоких ско-

ростях сдвига. В монографии указано также, что пасты часто являются дилатантными [8].

В соответствии с монографией ЕФ при производстве МЛС для обеспечения определенных реологических свойств могут при необходимости применяться следующие испытания: измерение консистенции пенетрометром (2.9.9) и кажущейся вязкости (2.2.10). Вышеизложенные фармакопейные положения определяют необходимость стандартизации реологических параметров МЛС и включения этих параметров в спецификации.

Для этого имеются и другие причины. Так, в руководстве ЕС «Фармацевтическая разработка и валидация процесса» [15] указано, что при разработке МЛС при необходимости следует проводить реологические исследования. Приложение G к Руководству 42-01-2001 «Лекарственные средства. Надлежащая производственная практика» [16] указывает на то, что «Готовые лекарственные средства в форме жидкостей, кремов, мазей, гелей и паст в большинстве случаев являются гетерогенными дисперсными системами и имеют специфические реологические свойства. Поэтому особое внимание следует уделять правильному ведению технологического процесса, применяемому оборудованию и температурным режимам хранения продукции, чтобы избежать неоднородности из-за неравномерного распределения компонентов, образования газовых эмульсий, дестабилизации дисперсных систем и отклонения от оптимальных значений реологических параметров».

Поскольку физическая стабилизация дисперсных систем в мягких лекарственных средствах во многом достигается за счет высоких значений реологических параметров, эти параметры становятся критическими для качества продукции; их важно правильно установить и затем контролировать. В соответствии с Руководством 42-01-2001, реологическим параметрам как критическим аспектам качества продукции следует уделять особое внимание при валидации технологических процессов.

Таким образом, реологические параметры мягких лекарственных средств:

- характеризуют их как лекарственную форму;
- обеспечивают необходимые потребительские свойства;
- являются критическими для качества;

- кроме того, реопараметры во многом определяют выбор рационального способа приготовления и параметров технологического процесса.

Академиком П.А. Ребиндером была разработана теория о лиофильных или термодинамически устойчивых и лиофобных или термодинамически неустойчивых дисперсных системах [3]. Для МЛС, которые являются преимущественно лиофобными дисперсными системами, важным фактором физической стабилизации является наличие коагуляционной структуры, обеспечивающей им тиксотропные свойства, пластический или псевдопластический тип течения и высокую структурную вязкость [3].

Природа коагуляционных структур может быть различной в зависимости от типа основ и применяемых вспомогательных веществ. Однако, в любом случае при разработке МЛС необходимо подобрать рациональный состав препарата, обуславливающий мазеобразную консистенцию и физическую стабильность при установленных условиях хранения, например, при температуре от 15 °С до 25 °С. При этом для стандартизации условий хранения надо, как минимум, определить, при каких температурах МЛС становится жидкостью, что создает предпосылки для проявления кинетической и термодинамической неустойчивости, а при каких температурах препарат по консистенции начинает приближаться к твердому телу, у которого отсутствует экструзия из туб.

Реологические свойства неньютоновских жидкостей могут зависеть от многих факторов, в том числе от качества и состава вспомогательных веществ, например, от молекулярной массы полимера, фракционного состава и т.д., которые не всегда определяются в соответствии со спецификациями на вспомогательные вещества. Поэтому в настоящее время многие фирмы, выпускающие жидкие и мягкие лекарственные средства, стандартизуют их по показателям структурной вязкости при определенных значениях градиента скорости.

Примером могут служить крем и шампунь Низорал, которые должны иметь при температуре 20 °С структурную вязкость соответственно от 5 Па·с до 30 Па·с и от 1 Па·с до 3 Па·с при градиенте скорости, находящемся между 5.0 с<sup>-1</sup> и 5.5 с<sup>-1</sup> [17,18]. Выбранные значения структурной вязкости находятся в достаточно широких интервалах. Однако каки-



ми бы ни были выбранные пределы структурной вязкости, они должны быть научно и экспериментально обоснованы в отчете о фармацевтической разработке препарата, в котором следует отражать критические для качества аспекты состава и технологии. Для мазей на гидрофильных основах, кремов и гелей таким критическим аспектом часто становятся их реологические параметры. Рассмотрим некоторые конкретные примеры.

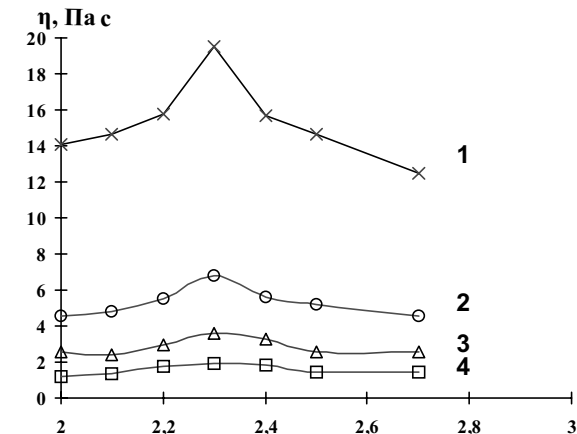
В предыдущих работах нами было показано, что из молекул эмульгатора первого рода и высших жирных спиртов образуются лиотропные жидкие кристаллы. Свойства этих жидких кристаллов зависят от ряда факторов, в частности, от соотношения между эмульгатором первого рода и высшими жирными спиртами, а также от температуры. Если лиотропные жидкие кристаллы имеют несферическую форму, твердообразные участки и достаточную лиофильность, которая обеспечивается коллоидным ПАВ, то уже при сравнительно низких концентрациях эмульгаторов (5-10 %) в объеме дисперсных систем из лиотропных жидких кристаллов образуются пространственные сетки и формируются коагуляционные структуры, благодаря которым обеспечивается мазеобразная консистенция и физическая стабилизация МЛС [19].

Для этого на этапе фармацевтической разработки подбирают оптимальное соотношение между эмульгатором первого рода и высшими жирными спиртами, которое обеспечивает максимальную структурную вязкость, и определяют реопараметры в зависимости от концентрации. Примером может служить разработка крема с кетоконазолом — аналога крема Низорал. Варьируя эти два фактора и основываясь на пределах структурной вязкости, предусмотренных для крема Низорал, был выбран состав эмульгаторов для препарата-генерика (Рис. 5 и 6). При этом было установлено, что пределы содержания эмульгаторов  $\pm 10\%$ , принимаемые регистрирующим органом без объяснений, позволяют структурной вязкости оставаться в пределах, установленных для импортного аналога.

При более существенных отклонениях в соотношении между эмульгатором первого рода и высшими жирными спиртами (например,  $\pm 30\%$ ) структурная вязкость понижается. Хотя ее значения остаются в пределах от 5 Па·с до 30 Па·с, установленных для крема Низорал, однако достаточно высокие значения структурной вязкости перестают при

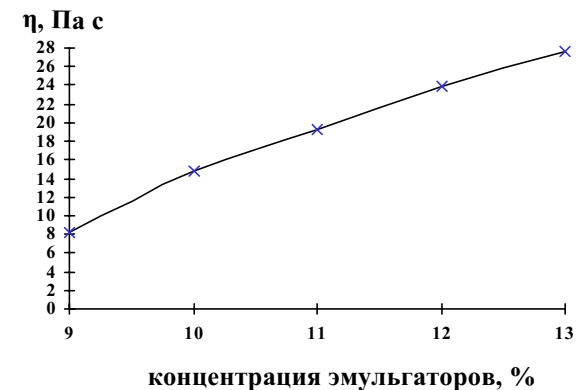
этом быть значимым фактором для стабильности крема, поскольку нисходящие участки кривой (Рис. 5) свидетельствует о возможной коагуляции крема при хранении.

Рисунок 5



Зависимость структурной вязкости кремов кетоконазола от концентрации (% масс.) эмульгатора 1 рода (при суммарном содержании эмульгаторов 1 и 2 рода 9.0 %) при температуре 20 °С при значениях градиента скорости сдвига ( $D_\gamma$ ): 1 – 5.4 c<sup>-1</sup>; 2 – 27.0 c<sup>-1</sup>; 3 – 81.0 c<sup>-1</sup>; 4 – 243 c<sup>-1</sup>

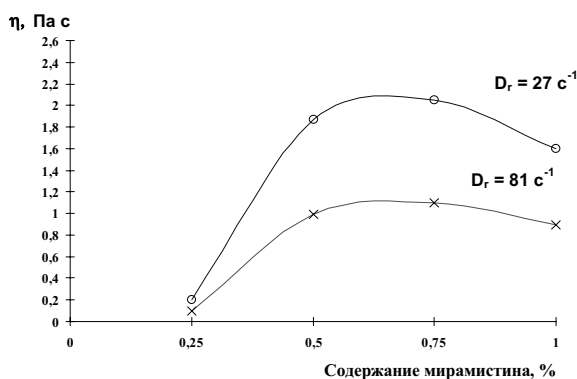
Рисунок 6



Зависимость структурной вязкости (при  $D_\gamma = 5.4 \text{ c}^{-1}$ ) кремов кетоконазола от суммарной концентрации эмульгаторов 1 и 2 рода при выбранном соотношении и температуре 20 °С

Структурная вязкость кремов зависит не только от соотношения между эмульгатором первого рода и высшими жирными спиртами, но и от фракционного состава высших жирных спиртов. На Рис. 7 представлена зависимость структурной вязкости мази «Тримистин» от соотношения мирамистина (эмульгатор первого рода) и спиртов синтетических первичных высших жирных фракции C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub> (эмульгатор второго рода) производства Уфимского нефтеперерабатывающего комбината (НПК) по ТУ 38.107119-85.

Рисунок 7



**Зависимость структурной вязкости крема «Тримистин» от концентрации мирамистина при температуре 25 °С и суммарной концентрации эмульгаторов 1 и 2 рода 5 %**

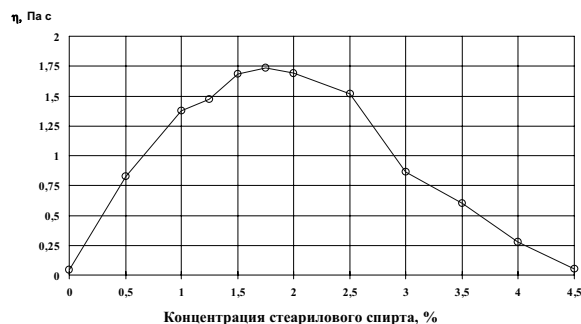
Как видно из Рис. 7, структурная вязкость проходит через максимум при определенном соотношении мирамистина и высших жирных спиртов; оптимальные соотношения находятся в пределах 0.5:4.5 — 0.75:4.25. Фракционный состав использовавшихся при разработке мази «Тримистин» высших жирных спиртов по ТУ 38.107119-85 не регламентировался. Однако технология их получения на Уфимском НПК обеспечивала относительно постоянный фракционный состав:  $C_{16} \sim 50\%$ ,  $C_{18} \sim 28\%$ ,  $C_{20} \sim 12\%$ , а также незначительное содержание изомеров этих спиртов и спиртов других фракций. Оказалось, что структурная вязкость зависит не только от соотношения между эмульгатором первого рода и высшими жирными спиртами, но при данном соотношении и от фракционного состава спиртов (Рис. 8).

Как видно из Рис. 8, применение в качестве эмульгатора второго рода только цетилового или только стеарилового спирта не эффективно. Структурная вязкость увеличивается при их совместном применении и проходит через максимум при определенном соотношении между цетиловым и стеариловым спиртами. Видимо, для каждого конкретного препарата при данной концентрации эмульгатора первого рода требуется смесь цетилового и стеарилового спиртов в определенном соотношении, которое обеспечивает максимальные значения структурной вязкости.

Достаточно высокие значения структурной вязкости на нисходящих участках кривой (Рис. 8), которые по абсолютной величине соответствуют структурной вязкости мази «Тримистин», содержащей 0.5 % мирамистина и 4.5 % высших жирных спиртов Уфимс-

кого НПК (Рис. 7), нельзя рассматривать в качестве значимого фактора для физической стабильности препарата, поскольку нисходящие участки кривой характерны для составов мази, расслаивающихся при хранении.

Рисунок 8



**Зависимость структурной вязкости (при  $D_r = 81 \text{ c}^{-1}$  и температуре 25 °С) мази «Тримистин» от концентрации стеарилового спирта (при концентрации мирамистина 0.5 % и суммарном содержании цетилового и стеарилового спиртов 4.5 %)**

В связи с вышеизложенным следует обратить внимание на следующее. Цетостеариловый спирт по требованиям ЕФ должен содержать не менее 40 % стеарилового спирта и не менее 90 % суммы цетилового и стеарилового спиртов [8]. В монографии ЕФ не стандартизован верхний предел содержания стеарилового спирта, а также пределы содержания цетилового спирта, т. е. не стандартизованы показатели, от которых зависит структурная вязкость и стабильность МЛС.

Требованиям фармакопейной монографии могут соответствовать различные торговые марки цетостеарилового спирта, например, марка Hydrenol D (фирма «Henkel», Германия), содержащая около 70 % стеарилового спирта и 30 % цетилового спирта, и марка Lanette 0 (фирма «Cognis», Германия), содержащая около 50 % цетилового спирта и 50 % стеарилового спирта.

Рассмотрим еще раз зависимость структурной вязкости от соотношения цетилового и стеарилового спирта (Рис. 8). Очевидно, что для данной конкретной мази «Тримистин» с 0.5 % мирамистина и 4.5 % цетостеарилового спирта марки «Lanette 0» еще можно получать вязкие стабильные системы. При использовании цетостеарилового спирта марки «Hydrenol D» препарат изначально имеет достаточно высокую структурную вязкость, однако он попадает в зону коагуляции, для которой свойственно расслаивание препарата при хранении. То есть, использовать при про-

изводстве мази «Тримистин» цетостеариловый спирт марки «Hydrenol D» только потому, что он соответствует требованиям ЕФ и позволяет получать при приготовлении препарат с достаточной структурной вязкостью нельзя. Это неминуемо приведет к скрытому браку, который проявится в виде физической нестабильности (коагуляции) при хранении препарата, его дистрибуции и применении.

Оптимальным для мази «Тримистин» является применение смеси цетилового и стеарилового спиртов («Lanette 16» и «Lanette 18») в соотношении примерно 70:30. Такое соотношение наиболее близко к фракционному составу высших жирных спиртов Уфимского НПК, которые можно заменить в мази «Тримистин» именно на такую смесь спиртов.

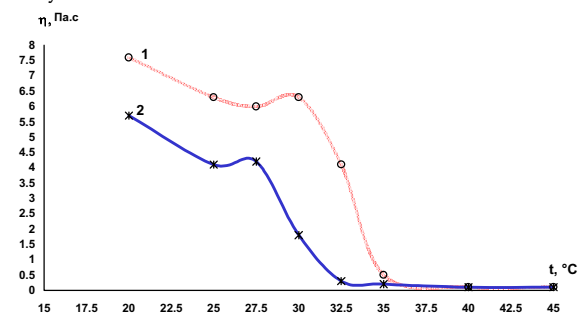
Таким образом, стандартизация МЛС по структурной вязкости без научно обоснованной связи со стандартизацией состава лекарственной формы и качества вспомогательных веществ является неприемлемой. На данном примере совершенно очевидно, что кроме фармакопейной монографии на цетостеариловый спирт, должна быть более подробная спецификация фирмы-производителя этого вспомогательного вещества и спецификация производителя МЛС, в которой должен регламентироваться фракционный состав цетостеарилового спирта.

Влияние состава высших жирных спиртов на реопараметры МЛС может также привести к изменению параметров технологического процесса (Рис. 9).

Как видно из Рис. 9, важным фактором, влияющим на реопараметры крема «Миконазол-Дарница» является температура. Соответственно значения реопараметров в зависимости от температуры обуславливают стандартизацию не только температурных условий хранения, но и технологического процесса.

При температуре 45 °С крем «Миконазол-Дарница» представляет собой ньютоновскую жидкость, динамическая вязкость которой при понижении температуры незначительно увеличивается. При определенной температуре на графике наблюдается перелом, соответствующий золь-гель переходу, при котором ньютоновская жидкость становится неньютоновской. В дальнейшем с понижением температуры структурная вязкость резко возрастает (Рис. 9).

Рисунок 9



**Изменение вязкости крема «Миконазол-Дарница» с понижением температуры при содержании в его составе цетостеарилового спирта «Hydrenol D» (1) и высших жирных спиртов Уфимского НПК (2)**

Как видно из Рис. 9, при использовании высших жирных спиртов с разным фракционным составом меняется не только величина структурной вязкости, но и температура золь-гель перехода. Если использовать цетостеариловый спирт марки «Hydrenol D», то суспензию миконазола нитрата необходимо вводить в мазевую основу при более высокой температуре, чтобы добиться однородного распределения лекарственного вещества в ее объеме. Это может привести к повышению растворимости миконазола нитрата в основе [21] с последующей неуправляемой кристаллизацией при охлаждении и образованием крупных кристаллов, размеры которых не соответствуют требованиям АНД.

При уменьшении температуры ниже золь-гель перехода у МЛС начинают проявляться тиксотропные свойства, которые предполагают разрушение структуры при приложении напряжений сдвига. На Рис. 9 видно, как в связи с этим график S-образно изгибается и структурная вязкость с повышением температуры начинает возрастать менее интенсивно. То есть, величина структурной вязкости становится зависимой от двух аспектов технологического процесса: температурных режимов охлаждения и режимов перемешивания. Вклад их в увеличение и уменьшение структурной вязкости соответственно может быть разным в зависимости от типа мазевой основы, а также скорости охлаждения и частоты вращения мешалок. Очевидно, что эти параметры технологического процесса должны быть стандартизованы, а сам процесс следует валидировать при масштабировании.

Логично предположить, что скорость перемешивания после гелеобразования следует ограничить. Однако имеются случаи, когда в кремевую или мазевую основу необхо-

димо вводить суспензии или растворы лекарственных веществ. При этом необходимо добиться однородности их распределения в лекарственной форме, для чего нужны высокие скорости перемешивания. Большая скорость вращения турбинной мешалки не повлияет на реопараметры МЛС, если перемешивание осуществляется при температуре 50-70 °С. Однако термолабильные вещества или субстанции, которые растворяются при высокой температуре, а при охлаждении кристаллизуются с образованием крупных кристаллов, следует вводить в основу при низких температурах.

При приложении высоких напряжений сдвига структурная вязкость МЛС, приготовленных на разных основах, может изменяться по-разному. Причем, для одних видов МЛС (например, кремов) она может восстанавливаться во времени, а для других (например, мазей на гидрофильных основах с высоким нижним пределом текучести) структура разрушается необратимо [20].

Для правильной разработки и составления протокола валидации технологического процесса подробные сведения о результатах реологических исследований должны быть изложены в отчете о фармацевтической разработке МЛС [15]. На этапе масштабирования и валидации процесса наряду с таким критическим аспектом, как однородность распределения лекарственных веществ в основе, следует определять реологические параметры мазей, кремов и гелей. То есть, при масштабировании технологического процесса выбор режимов технологического процесса, связанных с приложением к мягким лекарственным средствам напряжений сдвига, должен осуществляться под контролем структурной вязкости. В дальнейшем при серийном производстве может понадобиться осуществлять производственный контроль структурной вязкости по ходу технологического процесса. Например, всегда следует определять температуру гелеобразования в основе. Такой производственный контроль можно проводить либо визуально по уменьшению подвижности массы в реакторе-смесителе, либо с помощью реовискозиметров. Подходящие для этого портативные ротационные вискозиметры, позволяющие измерять структурную вязкость массы непосредственно в реакторе-смесителе, предоставляет фирма «Bioblock Scientific» (например, реовискозиметры марок С33628 или С33629).

Другими контрольными точками определения структурной вязкости являются: продукция в реакторе после окончания перемешивания, продукция перед выгрузкой из реактора и МЛС после дозирования в тубы. Структура МЛС на водорастворимых и водосмываемых основах может существенно разрушаться во времени под воздействием напряжения сдвига. Это потребует строгого соблюдения режимов перемешивания, уменьшения давления при выгрузке, ограничения производительности тубонаполнительного автомата, а также соответствующего производственного контроля реологических параметров [20].

Структурная вязкость мазей на гидрофобных основах и кремов на основе эмульсий первого рода, стабилизированных ПАВ и высшими жирными спиртами, как правило, мало зависит от прикладываемого напряжения сдвига при перемешивании в реакторе-смесителе, выгрузке из него под давлением, а также при дозировании в тубы при разной производительности тубонаполнительного автомата. После того, как этот факт установлен при фармацевтической разработке и валидации процесса, производственный контроль структурной вязкости для таких МЛС можно ограничить или исключить.

Рассмотрим еще некоторые случаи стандартизации составов МЛС на основании результатов изучения структурной вязкости. Так, например, очень существенным фактором для стандартизации составов гелей на основе карбомеров является соотношение между карбомером и щелочным агентом, от которого зависит величина рН и структурная вязкость [22]. Измерение структурной вязкости позволяет при разработке гелей:

- выбрать оптимальное соотношение между карбомером и щелочью;
- определить допуски для концентрации карбомера и щелочи;
- стандартизовать значение рН в необходимых пределах.

Однако по этим данным нельзя стандартизовать структурную вязкость геля, пределы для которой могут быть установлены только с учетом пределов молекулярной массы данной марки карбомера.

Определение структурной вязкости важно для определения взаимозаменяемости вспомогательных веществ. Если выше было продемонстрировано отсутствие взаимозаменяемости высших жирных спиртов Уфим-

ского НПК и цетостеарилового спирта марки «Hydrenol D», то, например, результаты исследования структурной вязкости позволяют сделать вывод о взаимозаменяемости карбомера-940 и карбомера-980 [22].

Таким образом, результаты исследований, проводившихся в лаборатории жидких и мягких лекарственных средств ГНЦЛС, показывают актуальность определения реологических параметров мазей, кремов и гелей методом ротационной вискозиметрии. Этот фармако-технологический тест должен найти широкое применение на этапах фармацевтической разработки, валидации и масштабирования технологического процесса с целью стандартизации составов и технологий мягких лекарственных средств, а также производственного контроля и контроля их качества.

### Выводы

1. Разработаны общие статьи Государственной Фармакопеи Украины 2.2.8 «В'язкість», 2.2.9 «Метод капілярної віскозиметрії» и 2.2.10 «Метод ротаційної віскозиметрії». Показана рациональность структуры и содержания указанных общих статей на основании их сравнительного анализа с соответствующими статьями Европейской Фармакопеи 4 изд., Государственной Фармакопеи СССР XI изд. и Фармакопеи США 24 изд.

2. Показано значение исследования вязкости и других реологических параметров при фармацевтической разработке, валидации технологического процесса, производственном контроле и контроле качества жидких и мягких лекарственных средств. Приведены некоторые результаты исследований вязкости и на этих примерах показаны критические аспекты состава и технологии, требующие применения фармакопейных методов вискозиметрии на этапах разработки и стандартизации состава и технологии, масштабирования процесса и серийного производства этих лекарственных форм.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Фиалков Ю.Я., Житомирский А.Н., Тарасенко Ю.А. Физическая химия неводных растворов. — Л.: Химия, 1973. — 376 с.
2. Дымент О.Н., Казанский К.С., Мирошников А.М. Гликоли и другие производные окисей этилена и пропилена. — М.: Химия, 1976. — 262 с.
3. Ребиндер П.А. Поверхностные явления в дисперсных системах. Физико-химическая механика. Избранные труды. — М.: Наука, 1979. — 384 с.
4. Крестов Г.А., Афанасьев В.Н., Ефремова Л.С. Физико-химические свойства бинарных растворителей: Справочник. — Л.: Химия, 1988. — 688 с.

5. Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии. — Изд. пятое. — К.: Наукова думка, 1987. — 830 с.
6. Определение молекулярных весов полимеров / А.И. Шатенштейн, Ю.П. Вырский, Н.А. Правикова и др. — М.-Л.: Химия, 1964. — 188 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001 — 556 с.
8. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - 2002. - P. 27-28, 559-560, 865-866.
9. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — С. 87.
10. United States Pharmacopoeia, XXIV ed. - USPC, 1999. — P. 2002-2003.
11. Эмульсии / Под ред. Ф. Шермана. — Л.: Химия, 1972. — 448 с.
12. Глестон С., Лейдер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. — М: Ин. лит., 1948. — 464 с.
13. Лысокобылка А.А., Безуглая Е.П., Ляпунов Н.А. Создание мягких лекарственных средств на различных основах. Сообщение 3. Влияние воды и эмульгаторов на реологические свойства водорастворимых мазевых основ. — Фармаком. — 2001. — № 4. — С. 23-29.
14. Безугла О.П. Розробка мазі з ацикловіром та її дослідження. — Вісник фармації. - № 2 (16). — С. 6-10.
15. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. — К.: МОРИОН, 2001. — 472 с.
16. Настанова 42-01-2001. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. — К.: МОЗ України, 2001. — 81 с.
17. НД 42-7574-00. Крем Низорал.
18. НД 42-4552-95. Шампунь Низорал.
19. Работы ГНЦЛС по созданию, внедрению и стандартизации мягких лекарственных средств и суппозиторий / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Н.Г. Козлова и др. — Фармаком. — 1999. — № 3. — С. 61-64.
20. Создание мягких лекарственных средств на различных основах. Сообщение 1. Исследование реологических свойств мазей на водорастворимых основах / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, А.Г. Фадейкина и др. — Фармаком. - 1999. — № 6. — С. 10-16.
21. Разработка вагинальных суппозиторий антимикробного действия на новых гидрофильных основах / Ю.М. Столпер, Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая и др. — Фармаком. — 2001. — № 3. — С. 84-91.
22. Ляпунов Н.А., Воловик Н.В. Создание мягких лекарственных средств на различных основах. Сообщение 1. Исследование реологических свойств гелей, образованных карбомерами. — Фармаком. — 2001. - № 2. — С. 52-61.

### Резюме

Ляпунов М.О., Безугла О.П., Терно І.С., Котов А.Г.

### Фармакопейні методи віскозиметрії при фармацевтичній розробці, виробництві та контролі якості рідких і м'яких лікарських засобів

Розроблені загальні статті Державної Фармакопеї України 2.2.8 «В'язкість», 2.2.9 «Метод капілярної віскозиметрії» та 2.2.10 «Метод ротаційної віскозиметрії». Проведений порівняльний аналіз зазначених загальних статей із відповідними статтями Європейської Фармакопеї 4 вид., Державної Фармакопеї СРСР XI вид. та Фармакопеї США 24 вид. Показано значення дослідження в'язкості та інших реологічних параметрів при

розробці, валідації технологічного процесу, виробничому контролю та контролі якості рідких і м'яких лікарських засобів. Наведено деякі результати досліджень в'язкості та на цих прикладах показано критичні аспекти складу й технології, що потребують застосування фармакопейних методів віскозиметрії на етапах фармацевтичної розробки, стандартизації, масштабування процесу та серійного виробництва цих лікарських форм.

#### Summary

Lyapunov N.A., Bezuglaya E.P., Terno I.S., Kotov A.G.

#### Pharmacopoeial methods of viscosimetry in development pharmaceuticals, manufacture and drug quality control of liquid and semi-solid drug dosage forms

The general monographs of the State Pharmacopoeia of Ukraine 2.2.8 «Viscosity», 2.2.9 «Capillary viscometer method» and 2.2.10 «Rotating viscometer method» were developed. The comparative analysis of specified general monographs with corresponding monographs of European Pharmacopoeia 4<sup>th</sup> edition, State Pharmacopoeia of USSR, XI edition and US Pharmacopoeia XXIV was carried out. The significance of viscosity and other rheological parameters when developing, engineering process validation, in-process control and quality control of liquid and semi-solid drugs was shown. Some results of viscosity study are given and using those as an example there were shown the critical aspects of formulation and technology requiring to use

the pharmacopoeial viscosimetry methods at the stages of development pharmaceuticals, standardization, process scaling-up and routine production of these dosage forms.

**Ляпунов Николай Александрович** (р. 1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт. Работает в ГНЦЛС (с 1972). Зав. лабораторией коллоидной химии дисперсных лекарственных форм (ЛКХДЛС) (1992). Зав. лабораторией жидких и мягких лекарственных средств ГНЦЛС (2001). Доктор фарм. наук (1990). Профессор (1993). Член Редакционного Совета Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ).

**Безуглая Елена Петровна.** Ст. науч. сотрудник лаборатории жидких и мягких лекарственных средств ГНЦЛС (1996). Канд. фарм. наук (1996).

**Терно Ирина Станиславовна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1985). Ст. науч. сотрудник ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1998). Канд. хим. наук (1992).

**Котов Андрей Георгиевич** (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ст. науч. сотрудник сектора ПСГ ГНЦЛС (2001). Канд. фарм. наук (1996).

УДК 615.454:616.5

Ляпунов Н.А., Столпер Ю.М.

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

### Фармако-технологический тест «Устойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению» при фармацевтической разработке, производстве и контроле качества готовых лекарственных средств

Материалы информационно-консультативного семинара «Особенности выполнения фармако-технологических испытаний Государственной Фармакопеи Украины», Харьков, 24-26 апреля 2002 года

Рассмотрен фармако-технологический тест «Устойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению», описанный в монографии 2.9.24 Европейской Фармакопеи 4 изд., и обоснована рациональность его включения в Государственную Фармакопею Украины. Показано значение исследования устойчивости к разрушению суппозиториев и пессариев при их разработке, валідації технологического процесса, производственном контроле и контроле качества. Приведены некоторые результаты исследований устойчивости к разрушению суппозиториев и на этих примерах показаны определенные критические аспекты состава и технологии, требующие применения указанного фармакопейного метода на этапах фармацевтической разработки, стандартизации, масштабирования процесса, серийного производства и контроля качества этих лекарственных форм.

Суппозитории и пессарии по классификации Европейской Фармакопеи и Государственной Фармакопеи Украины относятся к твердым лекарственным формам, что требует стандартизации их механических характеристик [1,2]. Показатели, характеризующие устойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению, важны на этапах их производства, транспортирования, хранения и применения.

Для этой цели применяется сравнительно новый фармако-технологический тест «Ус-

тойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению», впервые введенный в Европейскую Фармакопею 4 изд. (п. 2.9.24 «Resistance to rupture of suppositories and pessaries») [1].

Согласно Европейской Фармакопее, данное испытание проводят для суппозиториев и пессариев на жировой основе. Считается, что этот тест неприменим для препаратов на гидрофильной желатин-глицериновой основе, видимо, из-за ее низкой механической прочности. Однако, это испытание может использоваться для других типов гидрофильных

основ, обладающих достаточной механической прочностью, например, полиэтиленоксидных.

Цель работы – рассмотреть фармако-технологический тест «Устойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению», обосновать рациональность его включения в Государственную Фармакопею Украины и показать значение испытаний на устойчивость к разрушению суппозиториев и пессариев при их разработке, валидации технологического процесса, производстве и контроле качества.

**Объекты и методы исследований**

Объектом изучения служила статья Европейской Фармакопеи 4 изд. 2.9.24 «Resistance to rupture of suppositories and pessaries» [1].

Объектами исследования устойчивости к разрушению служили гидрофильные суппозиторные основы, содержащие полиэтиленоксиды с различной молекулярной массой, проксанол 268, гидрофильные растворители и различные эмульгаторы [3], а также липо-

фильные (жировые) суппозиторные основы [4].

Устойчивость суппозиториев к разрушению определяли на приборе SBT фирмы «Erweka» (Германия) по фармакопейной методике [1] путем измерения массы, необходимой для их разрушения раздавливанием. Эскиз прибора и схема рабочих поверхностей представлены на Рис. 1 и 2.

**Результаты и их обсуждение**

Прибор для проведения испытания (Рис. 1) состоит из термостатируемой камеры с держателем суппозиториев или пессариев, закрытой спереди стеклянным окошком, и двух противоположно расположенных зажимов. Верхний зажим опускается вертикально по направлению к нижнему зажиму.

Сдавливающие поверхности зажимов должны быть плоскими, расположенными перпендикулярно направлению движения и превосходить по размеру зону контакта с суппозиторием или пессарием. Пластмассовый

Рисунок 1

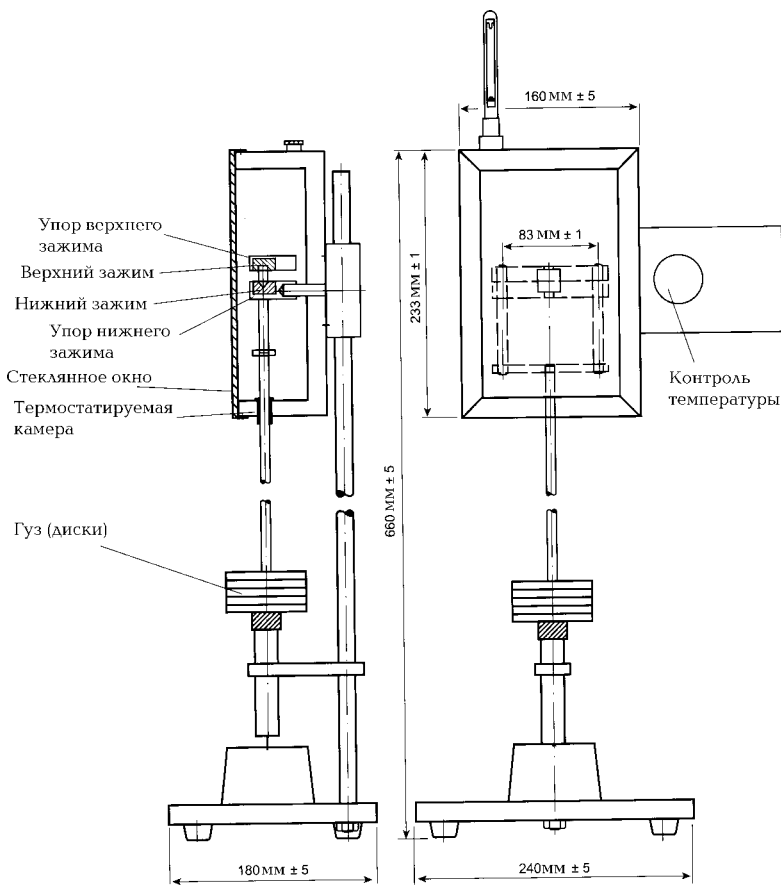
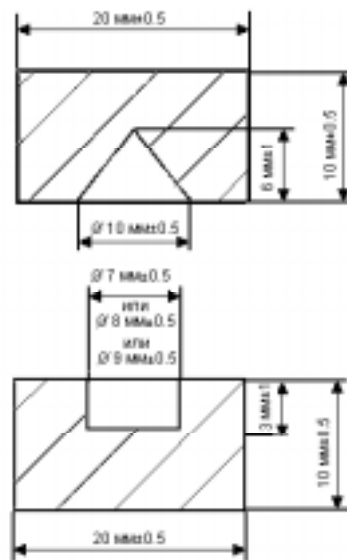


Рисунок 2



**Прибор для определения устойчивости суппозиториев и пессариев к разрушению**

**Схема рабочих поверхностей зажимов (в разрезе)**

держатель образцов установлен по центру зажимов (половина держателя на каждый зажим) (Рис. 2).

Верхний зажим (верхний прижимной блок) присоединен к подвеске, на которую могут быть установлены диски, массой 200 г каждый. Исходная масса прижимного блока составляет 600 г. Раздавливание препарата проводят, прибавляя последовательно диски массой 200 г к исходной массе 600 г.

Методика испытания, в соответствии со статьей Европейской Фармакопеи 4 изд., состоит в следующем [1]. Проверяют вертикальность установки прибора. Термостатируемую камеру нагревают до температуры 25 °С. Испытуемое лекарственное средство выдерживают при требуемой для испытания температуре не менее 24 ч. Суппозиторий или пессарий помещают вертикально между зажимами в держатель заостренным концом вверх. Осторожно устанавливают верхний прижимной блок, присоединенный к нагружаемому стержню подвески, и закрывают камеру стеклянным окошком.

Для каждого определения суппозиторий или пессарий устанавливают одинаково по отношению к направлению прилагаемой силы.

Через 1 мин устанавливают первый диск массой 200 г. Выдерживают 1 мин и устанавливают следующий диск. Операцию повторяют до разрушения суппозитория или пессария.

Вычисляют массу, необходимую для разрушения суппозитория или пессария, суммируя приложенную массу (включая исходную массу нагружаемого стержня с держателем), исходя из следующего:

- если суппозиторий или пессарий разрушается в течение 20 с после установления последнего диска, массу данного диска не учитывают;

- если суппозиторий или пессарий разрушается в течение отрезка времени между 20 с и 40 с после установления последнего диска, в расчет принимают только половину массы данного диска, то есть 100 г;

- если суппозиторий или пессарий остается неразрушенным более 40 с после установления последнего диска, в расчет принимают массу всех дисков.

Испытание проводят для 10 суппозиториев или 10 пессариев, удаляя полностью остатки образцов перед каждым определением.

Устойчивость к механическим нагрузкам является показателем качества, характеризующим потребительские свойства суппозиториев и пессариев, связанные с сохранением их формы и способом применения. Кроме того, устойчивость является показателем, косвенно свидетельствующим о физических и физико-химических взаимодействиях в суппозиториях как между компонентами препарата, так и между препаратом и окружающей средой. Поэтому с ним тесно связаны многие другие показатели качества суппозиториев, такие как температура плавления, распадаемость или растворимость, а также биодоступность.

В настоящее время не существует официально установленных фармакопейных норм по устойчивости суппозиториев к разрушению. Как следует из методики, нижним предельно допустимым значением устойчивости является 600 г. Приемлемыми эмпирическими нижними пределами для вагинальных препаратов являются 1-1.1 кг, для ректальных суппозиториев — 1.5-1.6 кг; такая устойчивость позволяет вводить лекарственные препараты интравагинально или ректально при сохранении их целостности и без изменения формы. Однако очевидно, что предел устойчивости должен быть выбран для каждого конкретного препарата в его взаимосвязи с другими показателями качества, в частности, с температурой плавления, распадаемостью или растворимостью и высвобождением или биодоступностью действующего вещества.

Устойчивость к разрушению рационально определять:

- на этапе фармацевтической разработки;
- при валидации и масштабировании технологического процесса;
- при производственном контроле;
- при контроле качества готовых лекарственных средств на момент выпуска и в процессе их хранения.

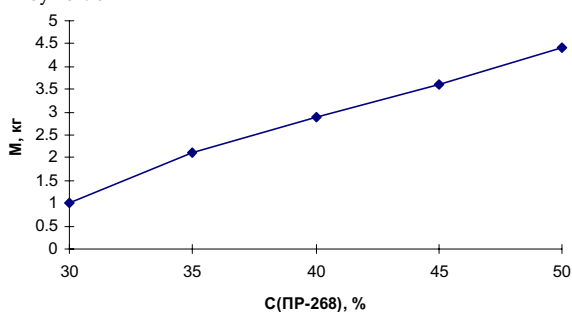
Устойчивость суппозиториев к разрушению следует учитывать, в первую очередь, на этапе фармацевтической разработки при выборе состава основы и параметров технологического процесса. Так, например, устойчивость гидрофильных основ возрастает с увеличением концентрации полимера-формообразователя (Рис. 3).

На устойчивость может влиять состав растворителей. На Рис. 4 показано, что устойчивость суппозиториев к разрушению вначале значительно возрастает при повышении



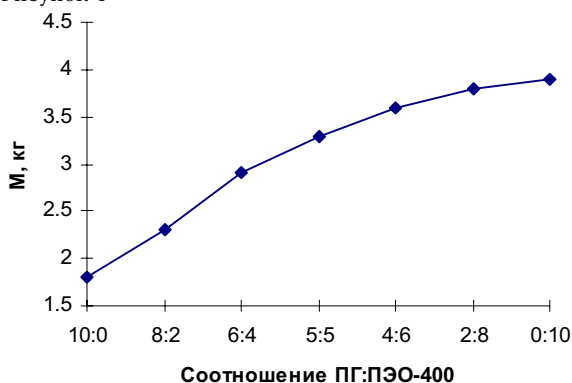
доли высокомолекулярного растворителя; с дальнейшим повышением концентрации ПЭО 400 интенсивность возрастания устойчивости понижается. Это связано с тем, что растворители взаимодействуют друг с другом и с полимером-формообразователем за счет образования водородных связей с формированием пространственной сетки. Наличие такой шивки при оптимальном соотношении гидрофильных растворителей обуславливает дополнительную устойчивость гидрофильной суппозиторной основы.

Рисунок 3



**Устойчивость гидрофильной основы в зависимости от концентрации полимера-формообразователя проксанола 268**

Рисунок 4

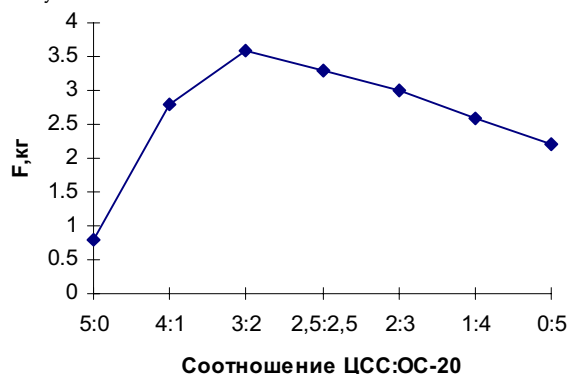


**Устойчивость гидрофильной основы в зависимости от соотношения гидрофильных неводных растворителей (пропиленгликоль/ПЭО-400)**

Не меньшее влияние на устойчивость суппозитория на гидрофильной основе оказывает природа и состав эмульгаторов. Как видно из данных, представленных на графике (Рис. 5), устойчивость основы в зависимости от соотношения компонентов комплексного эмульгатора может меняться в несколько раз. Это, видимо, обусловлено образованием коагуляционной структуры в суппозиторной основе [5], являющейся пластичным (вязкоэластичным) твердым телом. При приложении силы, превышающей критическую вели-

чину, такое тело необратимо деформируется [6]. Включение комплексных эмульгаторов может быть фактором, оказывающим существенное влияние на величину критической нагрузки, при которой суппозитории разрушаются.

Рисунок 5



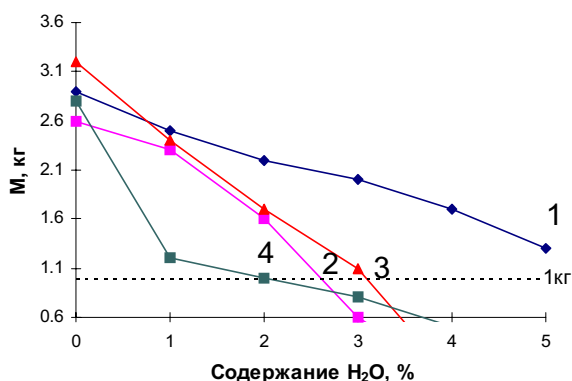
**Устойчивость гидрофильной основы в зависимости от состава комплексного эмульгатора (цетостеариловый спирт (ЦСС)/препарат ОС-20)**

на устойчивость к разрушению суппозитория на гидрофильных основах влияет содержание примесей в компонентах препарата. Так, например, их устойчивость уменьшается при добавлении воды. Введение в некоторые гидрофильные суппозиторные основы даже 1 % воды (основа, содержащая 20 % ПЭО 400 и 80 % ПЭО 1500) приводит к снижению их устойчивости до критической величины. Для гидрофильных основ, содержащих вместо ПЭО 1500 проксанол 268, критический уровень содержания воды оказывается выше (Рис. 6). Отсюда следует необходимость регламентации и контроля содержания влаги в компонентах препарата, а также относительной влажности в воздухе производственной зоны.

Важно изучить влияние параметров технологического процесса на устойчивость суппозитория к разрушению. Поскольку подавляющее большинство суппозитория готовится методом отливки в формы, к таким технологическим показателям могут относиться температурные режимы формования, то есть розлива суппозиторной массы в формовочные ячейки и температурно-временные режимы охлаждения. Как видно из графиков, представленных на Рис. 7, устойчивость различных основ проходит через максимум в зависимости от температуры охлаждения. Поэтому как для гидрофобных, так и для гидро-

фильных основ необходимо выбрать оптимальные температуру и время охлаждения.

Рисунок 6

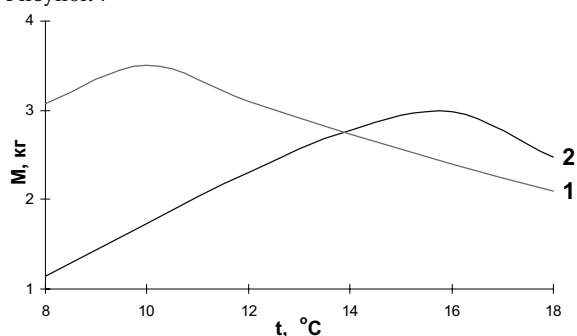


#### Устойчивость к разрушению различных гидрофильных основ в зависимости от содержания в них воды

- 1 — гидрофильная основа с проксанолом 268 без эмульгаторов;
- 2 — гидрофильная основа с проксанолом 268 и анионоактивным комплексным эмульгатором;
- 3 — гидрофильная основа с проксанолом 268 и неионогенным комплексным эмульгатором;
- 4 — полиэтиленоксидная основа (20 % ПЭО-400 и 80 % ПЭО-1500)

Зависимость устойчивости суппозитория к разрушению от температурных и временных режимов охлаждения необходимо учитывать при масштабировании процесса на конкретном технологическом оборудовании. При валидации технологического процесса должно быть показано, что выбранные режимы на данном оборудовании позволяют получать суппозитории с оптимальной устойчивостью.

Рисунок 7



#### Зависимость устойчивости к разрушению гидрофобной (1) и гидрофильной (2) основ от температурных режимов охлаждения

Таким образом, устойчивость суппозитория и пессария к разрушению может варьировать в зависимости от их состава, наличия примесей, параметров технологического про-

цесса и условий окружающей среды. Поэтому этот показатель необходимо учитывать не только на этапе фармацевтической разработки, но и при масштабировании и валидации технологического процесса. В настоящее время определение устойчивости суппозитория или пессария к разрушению не является обязательным тестом для включения в аналитическую нормативную документацию (АНД) на препараты в соответствующих лекарственных формах. Однако результаты проведенных исследований свидетельствуют, что этот показатель рационально стандартизировать и включать, как минимум, в спецификации на момент выпуска для гарантии того, что при транспортировке, хранении и применении суппозитория не разрушатся и будут сохранять свою форму. Учитывая вышеизложенное, тест «Устойчивость суппозитория и пессария к разрушению» перспективен для включения в Государственную Фармакопею Украины.

#### Выводы

Рассмотрена методика и описан прибор для фармако-технологического теста «Устойчивость суппозитория и пессария к разрушению». На основании результатов проведенных исследований показано, что устойчивость суппозитория к разрушению зависит от типа и состава основы, примесей, параметров технологического процесса и окружающей среды. Показана важность применения фармако-технологического теста определения устойчивости суппозитория и пессария к разрушению и необходимость его использования при фармацевтической разработке, масштабировании и валидации технологического процесса, производственном контроле и контроле качества. Обоснована целесообразность включения указанного теста в Государственную Фармакопею Украины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia, 4-th ed. - 2002.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — 556 с.
3. Пат. 15897 Україна, МПК А61К9/00, А61К9/02, А61К9/06, А61К47/10. Основа для мазей або супозиторіїв / Ляпунов М.О., Безугла О.П., Столпер Ю.М. та ін.. — 4 с.
4. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>nd</sup> Ed. / Ed. by Anley Wade and Paul J. Weller. - Washington/London, Amer. Pharm. Association: The Pharm. Press, 1994. — 651 p.
5. Столпер Ю.М., Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Сытник О.Ю., Зинченко А.А. Разработка вагинальных суппозитория антимикробного действия на новых гидрофильных основах // Фармаком. — 2001. — № 3. — С. 84-91.

6. Эмульсии / Под ред. Ф. Шермана. — Л.: Химия, 1972. — 448 с.

*Резюме*

Ляпунов М.О., Столпер Ю.М.

**Фармако-технологічний тест «Стійкість супозиторіїв і пессаріїв до руйнування» при фармацевтичній розробці, виробництві та контролі якості готових лікарських засобів**

Розглянуто фармако-технологічний тест «Стійкість супозиторіїв і пессаріїв до руйнування», який описано в монографії 2.9.24 Європейської Фармакопеї 4 вид., і обґрунтовано раціональність його включення до Державної Фармакопеї України. Показано значення дослідження стійкості супозиторіїв і пессаріїв до руйнування при їх розробці, валідації технологічного процесу, виробничому контролі та контролі якості. Наведено деякі результати дослідження стійкості супозиторіїв до руйнування і на цих прикладах показано певні критичні аспекти складу і технології, що вимагають застосування зазначеного фармакопейного методу на етапах фармацевтичної розробки, стандартизації, масштабування процесу, серійного виробництва та контролю якості цих лікарських форм.

*Summary*

Lyapunov N.A., Stolper Yu.M.

**Pharmaceutical technical test «Resistance to rupture of suppositories and pessaries» in development pharmaceuticals as well as in manufacturing and quality control of finished drugs»**

The pharmaceutical technical test « Resistance to rupture of suppositories and pessaries », described in the 4<sup>th</sup>

edition of European Pharmacopoeia monograph 2.9.24 is considered and the rationality of inclusion of one in the State Pharmacopoeia of Ukraine is justified. The significance of resistance to rupture of suppositories and pessaries study when developing, manufacturing process validating, in-process and quality control of ones is shown. Some results of resistance of suppositories and pessaries to rupture study are given; by these examples the certain critical aspects of formulation and technology requiring the mentioned pharmacopoeial method at a stage of development pharmaceuticals, standardization, process scaling-up, routine production and quality control of these drug dosage forms were shown.

**Ляпунов Николай Александрович** (р. 1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт. Работает в ГНЦЛС (с 1972). Зав. лабораторией коллоидной химии дисперсных лекарственных форм (ЛКХДЛС) (1992). Зав. лабораторией жидких и мягких лекарственных средств ГНЦЛС (2001). Доктор фарм. наук (1990). Профессор (1993). Член Редакционного Совета Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ).

**Столпер Юрий Михайлович** (р. 1971). Окончил Харьковский политехнический институт (1996). Мл. науч. сотрудник лаборатории жидких и мягких лекарственных средств ГНЦЛС (1997).

## До впровадження Державної Фармакопеї України

УДК 661.12:658.562.+615.076

Георгиевский В.П., Чайка Л.А., Хованская Н.П., Гомон О.Н., Меркулова Ю.В.  
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

### Биологические методы контроля качества лекарственных средств в Государственной Фармакопее Украины

Приведен краткий обзор общих статей по биологическим методам контроля качества в Государственной Фармакопее Украины 1-го изд. с анализом наиболее важных аспектов методик и интерпретации результатов сравнительно с Европейской Фармакопеей (ЕФ 2002), Фармакопеей США (USP 24), Государственной Фармакопеей СССР XI изд. (ГФ XI) и проектами соответствующих статей для Государственной Фармакопеи России XII изд. Разъясняются мотивы, которыми руководствовались авторы при подготовке статей для ГФУ, в т.ч. национальной части этих статей. На основании накопленного опыта и данных научной литературы излагаются некоторые общие рекомендации к проведению биологических испытаний (выбор тест-доз и др.).

Биологические методы анализа лекарственных средств, в зависимости от решаемых с их помощью задач, подразделяются на две группы:

- методы, с помощью которых проводится испытание чистоты и безопасности лекарств;
- методы, с помощью которых проводится количественное определение биологической

или, по сути, фармакологической активности лекарств.

Методы первой группы используются для контроля безопасности лекарств независимо от их фармакохимической принадлежности. Результаты этих методов оцениваются по альтернативному принципу — «да» или «нет», «соответствует» или «не соответствует».

Методы второй группы применяются для количественной оценки выраженности фармакологического эффекта, на основании чего путём сравнения с активностью стандарта определяется содержание в препарате действующего вещества.

В отличие от химических методов, биологические методы контролируют факторы, оказывающие биологические эффекты, независимо от природного или синтетического происхождения лекарственных субстанций, и этот контроль осуществляется только с помощью фармакологических, токсикологических, микробиологических или иммунологических методик.

В Табл. 1 представлен перечень биологических методов, каждый из которых является предметом специальных общих статей Государственной Фармакопеи Украины [1], Фармакопеи США (USP 24) [2], Европейской Фармакопеи (ЕФ 2002) [3] и Государственной Фармакопеи СССР 11-го издания (ГФ XI) [4]. Как видно из Табл. 1, перечень этих общих статей в разных фармакопеях весьма различается.

Так, Фармакопея США значительное внимание уделяет безопасности лекарств и опре-

делённых видов медицинской техники и оборудования, которые контактируют с парентеральными лекарственными средствами. Этот контроль по Фармакопее США осуществляется по 5-ти основным монографиям с несколькими разновидностями методик.

В Фармакопее США есть также общая статья, которая относится к биологическим методам контроля качества и которой нет аналогов в других Фармакопеях - по оценке на крысах, содержащихся на специальной голодной диете, белковой адекватности аминокислотных препаратов или гидролизатов белков.

В то же время Фармакопея США не предусматривает какого-либо испытания на депрессорные, или, как называли ранее, вещества гистаминоподобного действия, имеющего важное значение при оценке безопасности препаратов биологического происхождения (органопрепаратов).

Из методов количественного определения Фармакопея США сохранила в общих статьях только методику количественного определения инсулина, хотя известно, что в большинстве случаев это исследование проводит-

Таблица 1

**Общие статьи по биологическим методам контроля качества и количественного определения активности (исключая микробиологические и иммунохимические методы)**

USP 24 (2000)	ЕФ 2002	ГФ XI	ГФУ (2001)
Bacterial Endotoxins Test	Bacterial endotoxins (2.6.14.)	Испытание на пирогенность	Бактериальные эндотоксины (2.6.14.)
Pyrogen Tests (3 метода)	Pyrogens (2.6.8.)	Испытание на токсичность	Пирогены (2.6.8.)
Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices (2 альтернативных метода)	Abnormal Toxicity (2.6.9.)	Испытание на содержание веществ гистаминоподобного действия	Аномальная токсичность (2.6.9.)
Biological Reactivity Tests, in vitro (3 метода)	Depressor substances (2.6.11.)	Оценка активности сердечных гликозидов (3 метода и 7 разновидностей)	Депрессорные вещества (2.6.11.)
Biological Reactivity Tests, in vivo (6 методов, в т.ч. - Safety Tests – 2 метода)	Histamine (2.6.10.)	Определение активности инсулина (2 метода)	
Protein-Biological Adequacy Test	Assay of corticotropin (2.7.3.)	Статистическая обработка результатов биологических испытаний	
Insulin assays (2 метода)	Prekallikrein activator (2.6.15.)		
Design and Analysis of Biological Assays	Assay of blood coagulation factor VIII (2.7.4.)		
	Assay of heparin (2.7.5.)		
	Statistical analysis of results of biological assays and tests (5.3.)		

ся сейчас с помощью жидкостной хроматографии.

В отличие от Фармакопеи США, Европейская Фармакопея ограничивается набором из 5 общих статей, из которых 2 статьи посвящены контролю лекарств на вещества гистаминаподобного действия. Одна из них — «Депрессорные вещества», выполняемая *in vivo*, вторая — «Гистамин», выполняемая *in vitro*.

В общие статьи Европейской Фармакопеи по разделу 2.6 «Биологические испытания» и по разделу 2.7. «Биологические методы количественного определения» введены также количественные определения активности 4-х лекарственных субстанций: кортикотропина на гипофизэктомированных крысах, и 3-х субстанций, связанных со свёртыванием крови — гепарина, прекаликреина и VIII фактора свёртывания крови, активность которых оценивается *in vitro*.

Из Табл. 1 видно, что в ГФ XI, действующей пока в России и по некоторым разделам — в Украине, акцент был сделан на инсулине и сердечных гликозидах. Последние контролируются несколькими разными методами по 3 общим статьям, не считая разновидностей методик в каждой из них. Такое внимание к сердечным гликозидам можно объяснить тем, что 30-40 лет назад в бывшем СССР они были практически единственной серьёзной группой препаратов для кардиологии, а разработчики сердечных гликозидов и одновременно авторы этих монографий, специалисты ГНЦЛС, были особенно сильны именно в вопросах биологических методов их стандартизации.

Наряду с перечисленными в Табл. 1, применяются и другие биологические методы контроля качества и определения активности, не ставшие предметом отдельных общих статей и описанные в монографиях.

Основной темой настоящего сообщения является информация о биологических испытаниях, ставших предметом общих статей раздела 2.6 Государственной Фармакопеи Украины 1-го изд. (ГФУ). К ним относятся:

- статья 2.6.14 Бактериальные эндотоксины. Это испытание называют также ЛАЛ-тест, осуществляемый *in vitro*;

- статья 2.6.8 Пирогены. Испытание проводят на кроликах;

- статья 2.6.9 Аномальная токсичность. Испытание проводят на мышах;

- статья 2.6.11 Депрессорные вещества. Испытание проводят на кошках.

Выделенная курсивом терминология, как и нумерация статей в ГФУ, полностью соответствуют принятым в Европейской Фармакопее.

Перечисленные испытания в большой степени затрагивают интересы предприятий, производящих парентеральные препараты или субстанции для изготовления таких препаратов. Известно, что инъекционное или инфузионное введение лекарств человеку сопряжено с повышенным риском развития нежелательных и токсических эффектов, что предъявляет особые требования к качеству и безопасности этих средств [5].

Результаты соответствующих испытаний в определённой степени отражают уровень технологической культуры фармацевтического производства. Подтверждением тому является то, что один из этих методов — тест на бактериальные эндотоксины — за рубежом применяется также и для контроля чистоты технологического оборудования и некоторых видов медицинской техники.

В чём состоят общие требования и некоторые насущные рекомендации к проведению каждого из этих испытаний, в чём сходство или принципиальные различия требований к ним в ГФУ, USP и ЕФ, каковы перспективы развития биологических испытаний в свете гармонизации с мировыми правилами и стандартами?

Прежде всего, о тестах, с помощью которых осуществляют контроль на наличие и уровень в испытуемом продукте пирогенов.

Как известно, пирогенность лекарственных средств имеет, как правило, микробное происхождение и вызывается эндотоксинами грамотрицательных бактерий [6, 7]. Это высокотоксичные для человека липополисахаридные осколки клеточных стенок, которые образуются при разрушении бактериальной клетки. Эндотоксины очень устойчивы к обычным способам стерилизации, например, кипячению или автоклавированию.

Бактериальные эндотоксины обладают широким спектром нежелательных для организма человека биологических эффектов. Их перечень представлен в Табл. 2. Перечисленные эффекты серьёзно осложняют состояние пациентов при парентеральном, особенно инфузионном, введении препаратов, загрязнённых пирогенами, и могут привести к летальным исходам у больных, которые име-

ют тяжёлую хирургическую, токсикологическую или инфекционную патологию.

Таблица 2

**Токсические эффекты бактериальных эндотоксинов**

◆	Лихорадка с клиническими явлениями септицемии
◆	Токсическое воздействие на систему кроветворения с явлениями гранулоцитоза, эритроцитоза и тромбоцитопении
◆	Внутрисосудистая коагуляция крови вплоть до синдрома ДВС
◆	Эндотоксический шок в результате разрушения лизосом с высвобождением протеаз и др. вазоактивных медиаторов
◆	Резкие метаболические нарушения: потеря углеводов, повышение в плазме триглицеридов и жирных кислот, повышение активности ферментов цитолиза
◆	Анафилактический шок при повторных введениях

Опасность пирогенных загрязнений всегда существовала в реальных условиях отечественного фармацевтического производства. Не снизилась она и сейчас, когда наши предприятия широко используют относительно дешёвое сырьё китайских, индийских и некоторых других зарубежных производителей и посредников.

Многие годы для контроля уровня пирогенов в лекарственных препаратах использовали испытание на кроликах. Этот тест сохраняется в арсенале ведущих Фармакопей, несмотря на всё более широкое мировое распространение теста на бактериальные эндотоксины.

Учитывая реальные условия производства инъекционных препаратов на большинстве

украинских заводов, общая статья ГФУ, названная по-европейски «Пирогены», состоит из двух частей: европейской (над чертой) и национальной (под чертой), по сути, соответствующей аналогичной статье Фармакопеи США, но содержащей ряд важных дополнительных разъяснений, следовать которой рекомендуется, по крайней мере, до тех пор, пока производитель получит сертификат GMP.

Наиболее принципиальные различия между национальной частью ГФУ (USP 24) и ЕФ 2002 в испытании на пирогены приведены в Табл. 3. Из неё видно, что различия касаются таких узловых аспектов методики и интерпретации результатов испытания, которые, безусловно, связаны с его надёжностью и экономичностью. Опубликован подробный сравнительный анализ методик испытания на пирогены в разных Фармакопеях [8], который выявляет и ряд других, возможно менее принципиальных расхождений между этими Фармакопеями, в т.ч. и в действующей пока в России монографии ГФ XI, которая устарела, что признают и сами её авторы из России [9, 10].

Коротко о некоторых вопросах, которые, как показывает опыт, нередко возникают на предприятиях при контроле лекарственных средств на пирогены.

Прежде всего, о величине тест-дозы испытуемого препарата. Этот вопрос был предметом обсуждения в научной литературе более двух десятилетий.

Но кроме общих рекомендаций о минимальном и максимальном объёмах введения

Таблица 3

**Наиболее важные различия между национальной частью ГФУ (USP, 24) и ЕФ, 2002 в испытании на пирогены**

Показатели	ГФУ(USP 24)	ЕФ 2002
Этапы эксперимента и число кролей	3+5	3+3+3+3
Предварительное испытание реактивности кролей на в/в введение 0.9 % р-ра NaCl	Нет	Есть
Возможность принятия решения о пирогенности препарата на I этапе	Нет	Есть
Принцип учёта максимального повышения температуры (МПТ) на I этапе	Индивидуально у каждого кроля	По сумме у 3-х кролей
Предел МПТ: на I этапе	0.4°	1.15° ( $\bar{x} = 0.4^\circ$ )
на I + II этапах	3.3° ( $\bar{x} = 0.4^\circ$ )	2.8° ( $\bar{x} = 0.5^\circ$ )
на I + II + III этапах	-	3.3° ( $\bar{x} = 0.5^\circ$ )
на I + II + III + IV этапах	-	3.3° ( $\bar{x} = 0.6^\circ$ )

испытуемого раствора ни ГФ XI, ни одна из современных ведущих Фармакопей мира, не содержат каких-либо дополнительных разъяснений о подходах при расчёте тест-дозы для конкретного препарата.

Существовавшие долгое время рекомендации об 1/10-1/20 человеческой дозы лекарственного препарата, как якобы оптимальной для животных [6], подвергнуты её же авторами критике и обоснованно утратили значение из-за их малой практической пригодности [11, 12]. В новом проекте соответствующей российской статьи и в разъяснениях к ней эти рекомендации вообще не упоминаются [9, 10].

Наш собственный опыт и анализ соответствующих научных дискуссий показывают, что при разработке тест-дозы в испытании на пирогены на кроликах следует придерживаться следующих общих принципов:

- оптимальная величина тест-дозы в пересчёте на 1 кг массы тела животного должна быть максимально близкой к суточной терапевтической дозе для человека в пересчёте на 1 кг массы его тела [13], или, для большей надёжности, может превышать человеческую в 3-5 раз в соответствии с известными коэффициентами пересчёта средне эффективных доз между животными и человеком;

- следует избегать дополнительного разведения нативного раствора испытуемого препарата, если это не вызвано объективной необходимостью снижения его фармакологических или токсических эффектов, мешающих корректному проведению испытания на кроликах [11];

- если из-за фармакологических или токсических эффектов испытуемого препарата указанные рекомендации не удаётся выполнить, то его нативный раствор можно разводить, но не более чем в 8-10 раз, хотя это соответственно снижает надёжность испытания. При дальнейшем разведении испытание на кроликах утрачивает смысл и такой препарат, безусловно, необходимо контролировать на пирогены с помощью ЛАЛ-теста.

Ещё один общий вопрос: какие препараты обязательно контролировать на пирогены, а какие можно не контролировать?

Ведущие Фармакопей мира не содержат указаний на этот счёт. Однако, судя по зарубежной документации, поступавшей ряд лет в Фармакопейный комитет Украины, ведущие производители лекарственных средств, очевидно, в конкуренции за рынки сбыта дав-

но и однозначно решили этот вопрос — субстанции для инъекционных препаратов и сами такие препараты должны контролироваться на пирогены.

А в проекте российской общей статьи «Испытание на пирогенность» для ГФ XII прямо указывается: «Испытанию на пирогенность должны подвергаться все инъекционные лекарственные средства независимо от дозы, объёма и пути введения, используемых в клинике» [9].

Однако далеко не все препараты можно контролировать в испытании на кроликах. Основными препятствиями этому являются токсичность или фармакологические свойства, из-за которых невозможно осуществить данный тест.

В связи с этим, в США был разработан и с 1980 года официально введен в USP 20 тест на «Бактериальные эндотоксины», он же ЛАЛ-тест.

Этот тест за последние 10 лет получил всеобщее признание и включён во все Фармакопей мира наряду с тестом на пирогены, постепенно вытесняя последний из методов контроля всё большего числа препаратов. Тест на бактериальные эндотоксины основан на их способности вызывать свёртывание крови, о чём говорилось выше как об одном из серьёзных токсических эффектов эндотоксинов.

Для количественного или полуколичественного определения содержания бактериальных эндотоксинов в этом тесте используют кровь, точнее, лизат клеток крови рачков-мечехвостов *Limulus polyphemus*. В результате реакции между бактериальными эндотоксинами и лизатом, последний свертывается с образованием сгустка (тромба) в виде геля.

ЛАЛ-тест характеризуется высокой специфической чувствительностью и позволяет выявлять эндотоксины в количестве, которое в 100 раз ниже их минимальной пирогенной дозы (МПД) на кроликах [14]. Установлена тесная корреляция (до 85%) между результатами ЛАЛ-теста и испытанием пирогенности на кроликах, которая возрастает до 100 % в случаях, когда количество эндотоксина равняется или превышает МПД на кроликах [15].

Зарубежные производители предлагают специальное оборудование и реактивы, в том числе, стандарт эндотоксина, что упрощает и, главное, стандартизует контроль на наличие бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах. Просчитаны определенные финансово-экономические преимущества

использования ЛАЛ-теста в связи с исключением затрат на содержание кроликов, что особенно ощутимо при крупномасштабном производстве или когда производство инъекционных препаратов открывается впервые [7].

Анализ литературы [6, 7] и наш собственный опыт позволяют выделить определенные группы инъекционных препаратов, технологического оборудования и материалов, в которых испытание на содержание бактериальных эндотоксинов необходимо или желательно. К ним относятся:

- препараты, которые вызывают специфическое фармакологическое понижение температуры тела, что может маскировать наличие пирогенов в количестве, которое фактически не ниже, чем их МПД на кроликах (транквилизаторы, нейролептики, ненаркотические анальгетики-антипиретики, глюконат кальция, кортикостероиды, некоторые анестетики);

- препараты, которые вызывают повышение температуры тела, обусловленное фармакологическими или антигенными свойствами, что мешает объективному анализу действительных причин гипертермии у кроликов (препараты плаценты, вакцины, новокаин);

- препараты, которые непосредственно после введения так изменяют физиологичес-

кое состояние животных из-за их фармакологического действия или токсичности, что это не позволяет вести объективную термометрию согласно требованиям теста на пирогенность (средства для наркоза, наркотические анальгетики, снотворные средства, сердечные гликозиды, депольризующие миорелаксанты, адреналин, инсулин);

- инфузионные препараты, суточный объем введения которых человеку составляет 500 мл и выше;

- препараты, предназначенные для наиболее ответственного пути введения - интратекального - и поэтому требующие особенно жесткого контроля на пирогены даже тогда, когда их количество ниже, чем МПД на кроликах;

- препараты, после первого введения которым кроликам, повторное использование тех же животных затрудняется или исключается (препараты с антигенными свойствами, антибиотики, противоопухолевые препараты);

- радиофармацевтические препараты, испытание которых на кроликах требует специального дорогостоящего оборудования и больших объемов раствора (из-за быстрого распада большинства радиоизотопов), что делает это испытание практически недостижимой задачей;

Таблица 4

**Бактериальные эндотоксины: разработка методик и предрегистрационный контроль в ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1999-2002)**

Препарат	Фирма-производитель
<b><u>Разработка методик</u></b>	
1. Спазмалгон, р-р д/и	«Софарма»
2. Бупивакаин, р-р д/и	«Здоровье народу»
3. Дифенал, р-р д/и	«Здоровье»
4. Кальция хлорид, р-р д/и	«Дарница»
5. Рибоксин, р-р д/и	«Дарница»
6. Гентамицин, р-р д/и	«Дарница»
7. Аскорбиновая к-та, р-р д/и	«Дарница»
<b><u>Предрегистрационный контроль</u></b>	
1. Альвеофакт, сусп. для эндобронх. влив.	«Берингер Ингельхайм»
2. Виролекс, лиофилизат д/и	«КРКА»
3. Гинипрал, концентрат д/инф.	«Никомед»
4. Кеторол, р-р д/и	«Д-р Реддис»
5. Пропофол, эмульсия д/инф.	«Фрезениус»
6. Сумамед, лиофилизат д/и	«Плива»
7. Эпирубицин, р-р д/и	«Эбеве»
8. Этиол, лиофилизат д/и	«Шеринг Плау»
9. Натрия хлорид, субстанция	«Славянская соледобывающая компания»
10. Кардиджект, концентрат д/инф.	«SUN Pharmaceuticals»



- лекарственное сырье, прежде всего, вода для инъекций, а также ампулы, флаконы и все элементы технологического оборудования, которые используются в производстве промежуточных продуктов и готовых лекарственных средств для парентерального введения.

Вообще, исходя из того, что в подавляющем большинстве именно бактериальные эндотоксины являются причиной пирогенных реакций, контроль на пирогены с помощью ЛАЛ-теста теоретически может быть распространён на большую часть парентеральных препаратов и субстанций для них, как это динамично происходит за рубежом.

Так, в USP 22 (1990) ЛАЛ-тестом контролировалось 342 лекарственных средства, а в USP 24 (2000) их количество составляет более 660 наименований. В зарубежных спецификациях, поступавших в ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» в последние годы уже почти нет препаратов, которые контролировались бы иначе, как ЛАЛ-тестом.

В отличие от испытания на пирогены на кроликах, испытание на бактериальные эндотоксины находится в стадии активных научных исследований. В результате соответствующие общие статьи в ведущих Фармакопеях претерпевают постоянные довольно ощутимые изменения и дополнения.

При этом в общей статье ЕФ 2001 впервые появились разъяснения о гармонизации физической сущности единиц измерения бактериальных эндотоксинов в Европейской Фармакопее и Фармакопее США, за которой, естественно, следует гармонизация средств и методов измерения содержания бактериальных эндотоксинов в этих Фармакопеях.

Повсеместное распространение ЛАЛ-теста за рубежом обусловлено рядом факторов финансово-экономического, экологического и маркетингового характера. Среди них важное значение имеет более высокая надёжность и универсальность этого метода, что в условиях производства по правилам GMP становится одним из рычагов повышения конкурентоспособности продукции.

Это обстоятельство немаловажно и для отечественных производителей парентеральных препаратов, поскольку ситуация на фармацевтическом рынке Украины, хоть и с отставанием, но всё таки следует мировым законам рыночной экономики.

Очевидно, что Государственная Фармакопея Украины не может идти вразрез с обще-

мировой практикой, поэтому в ГФУ 1-го изд. и включена статья 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины», полностью гармонизированная со статьей Европейской Фармакопеи и содержащая в национальной части лишь дополнительные разъяснения касательно используемых реактивов и стандарта эндотоксинов.

Вероятно, что в экономических интересах отечественных производителей внедрение ЛАЛ-теста лучше начать уже сейчас и проводить это постепенно, прежде всего, для препаратов, которые по объективным причинам невозможно испытывать на кроликах. Реально, этот процесс уже начался на таких заводах, как «Дарница», «Здоровье народу», «Здоровье», «Галичфарм».

В лаборатории фармакопейного анализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» накоплен достаточный опыт как по разработке методик анализа лекарственных средств на бактериальные эндотоксины, так и по предрегистрационному контролю лекарств с помощью ЛАЛ-теста, в т.ч. для известных зарубежных компаний и крупных отечественных производителей (Табл. 4).

Относительно третьего из обсуждаемых биологических методов — *испытания на аномальную токсичность*. Его название в ГФ XI - испытание на токсичность - совершенно не отвечает истинным задачам данного теста, в силу чего он долгое время вызывал непонимание специалистов заводов и научных работников. И нам в первые годы нередко приходилось участвовать в непродуктивных дискуссиях типа: «зачем испытывать на токсичность строфантин, когда и так хорошо известно, что он очень токсичен?».

В действительности, основная цель испытания — это выявление аномальной токсичности препарата, т.е. такую, которая превышает установленный ранее допустимый её уровень. Это может случиться, если в составе препарата при производстве или хранении произошли изменения, непредусмотренные регламентом производства или АНД.

Испытание на аномальную токсичность позволяет предупредить об ухудшении качества препарата и опасности его медицинского применения, если обнаруживается повышение токсичности сверх допустимого уровня, т.е. *аномальной токсичности*, что может контролироваться по неожиданному повышению летальности или по неожиданным явлениям интоксикации животных.

Особенно большое значение данный тест имеет при контроле качества препаратов, которые производятся без соблюдения правил GMP. Опыт показывает, что именно в таких условиях возможны отклонения от регламентированного технологического режима, непреднамеренные изменения в качественном или количественном составе действующих и вспомогательных веществ (например, при смене поставщика субстанций), или ошибки (например, в маркировке).

Редко, но, к сожалению, у нас возникают неприятные вопросы по результатам этого теста и к качеству некоторых зарубежных субстанций, которые, если верить поставщикам, производятся там по правилам GMP.

В прежние годы нам также приходилось сталкиваться с просьбами отечественных производителей о пересмотре в меньшую сторону уровня тест-доз производимого препарата в испытании на аномальную токсичность, т.к. при ранее установленном уровне тест-дозы он «вдруг» перестал выдерживать испытание, хотя по остальным показателям удовлетворял требованиям АНД. Внимательное и честное выяснение выявляет, обычно, в таких случаях, либо какие-то усовершенствования в технологии производства, либо использование субстанций иных поставщиков.

Изложенное выше убеждает нас в необходимости введения испытания на аномальную токсичность для всех без исключения парентеральных препаратов.

Тест на аномальную токсичность, наряду с испытанием на пирогены, играет важную роль при контроле безопасности лекарственных средств. Возможно, именно поэтому соответствующие общие статьи в USP и в российском проекте ГФ XII, так и названы - «Тест на безопасность» [16].

Статья «Аномальная токсичность» в ГФУ по принципиальным разделам методики и интерпретации результатов, в основном, повторяет соответствующую статью Европейской Фармакопеи. В национальную часть мы ввели некоторые дополнительные разъяснения и требования, главными из которых являются учет характера и выраженности явлений интоксикации при испытании на первых 5 мышцах с количественной градацией этих явлений по признаку частоты. Это дополнение соответствует рекомендациям USP 24 и российского проекта статьи «Тест на безопасность» ГФ XII [16].

Кроме того, наш собственный опыт показывает, что при испытании на аномальную токсичность иногда возникают ситуации, когда по критерию «летальность» испытуемый препарат проходит, но у части или у всех животных наблюдаются явления интоксикации, наличие и выраженность которых никак не оговорены в частной статье.

Безусловно, что при корректно выбранной тест-дозе проявления интоксикации вообще должны отсутствовать или быть минимальными. При этом их характер (клиническая картина, выраженность) и частота возникновения должны регламентироваться в частной статье. Вполне очевидно, что количественный учет симптомов интоксикации наряду с летальностью существенно повышает надежность испытания на аномальную токсичность как одного из методов контроля безопасности препарата.

Четвёртый из обсуждаемых биологических методов контроля безопасности — *испытание на депрессорные вещества* (согласно ГФ XI, испытание на содержание веществ гистаминоподобного действия) выполняют с целью исключения опасности снижения у пациентов артериального давления после введения препарата, если в его составе при производстве оказались вещества, обладающие гипотензивным (депрессорным) действием.

Наиболее опасны в этом отношении органолептические препараты, получаемые из тканей животных и человека или путем микробиологического синтеза, так как при этом в них могут оказаться высокоактивные депрессорные вещества — гистамин, брадикинин, некоторые пептиды и др.

Примером таких препаратов являются широко известные экстракт плаценты, спленин, ряд антибиотиков.

Несмотря на очевидную полезность данного испытания для указанной категории лекарств, ситуация с ним в разных Фармакопеях значительно различается.

Так, в Европейской Фармакопее контролю на депрессорные вещества посвящены, как уже было сказано выше, две общие статьи: «Депрессорные вещества» и «Гистамин», методы которых выполняются, соответственно, на кошках и *in vitro* на изолированных полосках толстого кишечника морских свинок. В Европейской Фармакопее в 1999-2000 годах обсуждался вопрос об отмене первого из этих тестов в связи с общемировой практикой ог-

раничения экспериментов на животных. Но, в издании 2002 года этот тест сохранился.

В Фармакопеях США вплоть до USP 23 всегда был только один тест — на депрессорные вещества на кошках. В USP 24 этого теста уже нет. Непонятно, и этому возможно только одно объяснение, что в США нет препаратов, подобных экстракту плаценты или спленину.

Российские авторы в проектах ГФ XII также предлагают две общие статьи «Испытание на содержание веществ депрессорной природы» [17] и «Испытание на содержание гистамина» [18], которые описывают те же два методических подхода, что и Европейская Фармакопея.

В Государственной Фармакопее Украины 1-го изд. мы пока ограничились одной общей статьей «Депрессорные вещества» с испытанием на кошках, которая практически полностью соответствует статье с тем же названием ЕФ 2002. Нам представлялось, что это испытание отечественным производителям по экономическим соображениям легче наладить, по сравнению с методом на изолированном кишечнике. Так, для испытания на кошках, относительно простой, но достаточный по характеристикам регистратор давления с самописцем стоит от 3 до 5 тыс долларов США, на одной кошке можно испытать минимум 2 серии препарата, а содержать их больше двух дней не нужно и нельзя, т.к. они погибают в неволе. В то же время, самая простая установка для работы с изолированными гладкомышечными органами стоит сегодня не меньше 15 тыс долларов США, а морские свинки дороже кошек как по стоимости, так и по содержанию.

Возможно, теми же мотивами руководствовались и в Европейской Фармакопее, когда при уже почти принятом решении об отмене испытания на кошках, оно всё же сохранилось в издании 2002 года.

Одновременно следует отметить, что лаборатория фармакопейного анализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по заказам отечественных предприятий выполняет анализ лекарственных средств на депрессорные вещества.

В заключение мы хотели бы проинформировать о некоторых ближайших планах, касающихся дальнейшей подготовки общих статей по биологическим методам анализа, а также нашей позиции относительно внедре-

ния биологических методов на отечественных предприятиях.

Прежде всего, в соответствии с гармонизацией с Европейской Фармакопеей, необходимо срочно пересматривать статью «Бактериальные эндотоксины», которая в ЕФ 2002 содержит ряд новых положений и разъяснений.

Очевидно, что по мере сертификации украинских предприятий по требованиям GMP, потребуется также разработка и внедрение метода контроля чистоты технологического оборудования с помощью ЛАЛ-теста, который для этих целей описан в отдельной общей статье в USP 24.

Наряду с этим, накопив достаточный опыт и располагая необходимым оборудованием для ЛАЛ-теста, мы хотели бы сосредоточить усилия и на помощи нашим заводам в планомерной разработке и внедрении этого метода в производстве лекарственных средств.

Очевидно, что в ходе подготовки следующего издания Государственной Фармакопее Украины следует внимательно изучить вопрос о целесообразности введения в неё общей статьи «Гистамин», являющейся альтернативным методом *in vitro* для испытания препаратов на депрессорные вещества. При этом следует, прежде всего, руководствоваться надёжностью оценки безопасности лекарственных средств с помощью этих двух методов, учитывать как опыт Европейской Фармакопеей, так и возможности отечественных производителей.

Результаты биологических методов анализа, имея крайне важное значение как для производителей, так и для потребителей лекарств, во многом зависят от надёжности статистических методов анализа. Из Табл. 1 видно, что каждая из ведущих Фармакопей содержит общую статью по статистической обработке результатов биологических испытаний.

В связи с этим, представляется остро необходимой соответствующая общая статья и в ГФУ. Её разработка силами привлечённых специалистов по статистическим методам к настоящему времени завершена.

Что касается биологических методов количественного определения активности отдельных лекарственных субстанций, то в большинстве случаев, они должны быть предметом, а точнее, частью соответствующих монографий. Но, как и в Европейской Фармакопее, в общую статью, очевидно, в первую оче-

редь, следует вынести определение активности гепарина, субстанция которого входит в состав многих препаратов, в т.ч. и комбинированных.

Биологические методы анализа — это особая область в общей системе контроля качества и безопасности лекарственных средств. Биологические методы контроля часто позволяют выявлять такие неожиданные и нежелательные свойства в испытуемом препарате, которые не определяются иными способами. С полным на то основанием можно утверждать, что эти методы являются важным и неотъемлемым дополнением к физико-химическим методам контроля качества лекарств, и в ближайшем будущем им нет альтернативы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
2. United States Pharmacopoeia. The National Formulary, XXIV ed. - Rockville, 2000.
3. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - 2002.
4. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
5. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
6. Варченко В., Кравчук С. Инфузійні розчини: минуле та сучасне // Вісник фармакології та фармації. — 2002. - № 2. — С. 28-37.
7. Крылов Ю.Ф., Кивман Г.Я. Биологический контроль безопасности лекарственных средств. - М., 1985. - 143 с.
8. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. — М., 1997. — 95 с.
9. Чайка Л.О., Хованська Н.П., Гомон О.М., Меркулова Ю.В. Пірогени. Проект загальної статті Державної Фармакопеї України // Фармаком. — 2001. - № 2. — С. 18-25.
10. Долгова Г.В., Кивман Г.Я., Неугодова Н.П., Рыков А.С., Еникеева З.Н. Испытание на пирогенность (проект общей статьи для Фармакопеи XII) // Фарматека. - 1999. - № 3. - С. 30-34.
11. Долгова Г.В., Кивман Г.Я., Рыков А.С., Неугодова Н.П., Еникеева З.Н. Новый подход к оценке результатов испытаний лекарственных средств на пирогенность, проводимых по схеме Европейской Фармакопеи // Химико-фармацевтический журнал. — 1999. - № 2. - С. 48-55.
12. Кивман Г.Я., Еникеева З.Н. Калинина Н.А. Испытание лекарственных средств на пирогенность. I. Препараты, дозы, способы введения / Хим.-фарм. журнал. — 1980. - № 6. — С. 102-106.
13. Еникеева З.Н., Кивман Г.Я. Испытание лекарственных средств на пирогенность. II. Целесообразность и границы унификации дозы препарата / Хим.-фарм. журнал. — 1981. — № 11. — С. 122-125.
14. Побережная З.Н., Каграманова К.А., Кивман Г.Я. К вопросу о причинах пирогенности лекарственных средств и их контроля по этому показателю / Тез. докл. III съезда фармацевтов Украинской ССР. - Харьков. — 1997. — С. 209.
15. Cooper T.F. Acceptance of the limulus test as an alternative pyrogen test for radiopharmaceutical and intrathecal drugs // Progr. Clin. Biol. Res. - 1979. - V. 29. - P. 345-352.
16. Harrison S.J., Tsuji K., Enzinger R.M. Application of LAL for detection of endotoxin in antibiotic preparations // Progr. Clin. Biol. Res. - 1979. - V. 29. - P. 353-365.
17. Березовская И.В. Тест на безопасность // Фарматека. — 1994. - № 3. — С. 6.
18. Испытания на содержание веществ депрессорного действия // Фарматека. — 1994. - № 4. — С. 3-4.
19. Испытание на содержание гистамина // Фарматека. — 1994. - № 4. — С. 5.

#### Резюме

Георгієвський В.П., Чайка Л.О., Хованська Н.П., Гомон О.М., Меркулова Ю.В.

#### Біологічні методи контролю якості лікарських засобів у Державній Фармакопеї України

Наведений стислий огляд з біологічних методів контролю якості у Державній Фармакопеї України 1 го вид. із аналізом найбільш важливих аспектів методик і інтерпретації результатів порівняно із Європейською Фармакопеєю (ЄФ 2002), Фармакопеєю США (USP 24), Державною Фармакопеєю СРСР XI вид. (ГФ XI) і проектами відповідних статей для Державної Фармакопеї Росії XII вид. Роз'яснюються мотиви, якими керувалися автори при підготовці статей для ДФУ, у т.ч. національної частини цих статей. На основі набутого досвіду та даних наукової літератури викладаються деякі загальні рекомендації до проведення біологічних випробувань (вибір тест-доз та ін.).

#### Summary

Georgiyevskiy V.P., Chaika L.A., Khovanskaya N.P., Gomon O.N., Merkulova Yu.V.

#### Biological methods of drug quality control in the State Pharmacopoeia of Ukraine

The brief review of general monographs on quality control biological methods in the State Pharmacopoeia of Ukraine, 1<sup>st</sup> edition, along with an analysis of most important aspects of procedures and data interpretation in comparison with European Pharmacopoeia (PhEur 2002), US Pharmacopoeia (USP 24), State Pharmacopoeia of the USSR, XI edition (GF XI) and drafts of corresponding monographs for State Pharmacopoeia of Russia, 12 edition, is given. The reasons followed by authors when developing the monographs for GFU, including the national part of these monographs, are explained. On the basis of cumulative experience and scientific literature data some general recommendations on the biological tests conducting (the choice of test-doses, etc.) are stated.

**Георгієвський Віктор Петрович.** Директор ГНЦЛС. Директор ГП «Науково-експертний фармакопейний центр». Председатель Бюро Редакційної колегії Государственной Фармакопеї України. Доктор фарм. наук. Професор. Академик Международной инженерной академии, Инженерной академии Украины и Нью-Йоркской академии наук. Засл. деятель науки и техники Украины.

**Чайка Леонид Александрович** (р.1942). Окончил Харьковский медицинский институт. Работает в ГНЦЛС (с 1968). Зав. лабораторией общей фармакологии (1991). Канд. мед. наук (1981).

**Хованская Наталья Петровна.** Окончила Харьковский государственный университет. Работает в ГНЦАС (с 1970). Зав. лабораторией фармакопейного анализа ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр". Канд. фарм. наук (1992).

**Гомон Ольга Николаевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1979). Работает в ГНЦАС. Ст. науч. сотр. лаборатории общей фармакологии. Канд. биол. наук (1997).

**Меркулова Юлия Вагимовна.** Окончила Харьковский государственный университет (1983). Работает в ГНЦАС (с 1993). Науч. сотр. лаборатории общей фармакологии.

Этой публикацией мы открываем серию статей, освещающих вопросы определения содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах, включая детальный анализ всех этапов проведения ЛАЛ-теста при контроле препаратов на предприятии. Наши статьи будут затрагивать следующие аспекты ЛАЛ-теста:

- расчет предельного содержания эндотоксинов, максимально допустимого разведения и минимально допустимой концентрации для препарата или субстанции;
- особенности проверки заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива;
- предварительные этапы исследования препарата;
- воспроизведение теста на мешающие факторы;
- проведение гель-тромб теста при серийном контроле препарата.

*Каждый из этих вопросов будет рассмотрен с позиции общей статьи «Бактериальные эндотоксины» Государственной Фармакопеи Украины, Фармакопеи США и Европейской Фармакопеи, рекомендаций FDA, а также с учетом возможности использования реактивов различных фирм-производителей.*

УДК 661.12:658.562+615.076

Меркулова Ю.В., Гомон О.Н., Чайка Л.А., Хованская Н.П.  
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## **Определение содержания бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест) – фармакопейный метод. Сообщение 1**

Статья посвящена одному из методов биологического контроля лекарственных средств на пирогены – ЛАЛ-тесту (метод определения содержания бактериальных эндотоксинов). Рассматриваются различные аспекты использования ЛАЛ-теста на фармацевтических предприятиях, обсуждается целесообразность замены теста «Пирогенность» на ЛАЛ-тест при контроле качества инъекционных препаратов, анализируется цель и задачи экспериментальных исследований на этапе разработки и валидации метода определения бактериальных эндотоксинов в конкретном препарате.

45 лет назад американский ученый Ф.Б. Банг, исследуя мечехвостов - древнейших морских животных, обитающих у восточных берегов Северной и Центральной Америки, обнаружил, что введение в их внутрисосудистое русло бактерий вызывает свертывание крови и гибель животного [1]. Аналогичная реакция наблюдалась при внутрисосудистом инъецировании мечехвосту не живых бактерий, а только их эндотоксинов, которые содержатся в клеточной стенке грамотрицательных микроорганизмов. Это открытие вызвало особый интерес, т.к. эндотоксины - именно те вещества, которые в подавляющем большинстве случаев являются причиной пирогенности лекарственных препаратов.

### *ЛАЛ-тест - фармакопейный метод контроля лекарственных средств*

Открытие Ф.Б. Банга положило начало разработке метода количественного определения бактериальных эндотоксинов в самых различных средах. Наиболее важной и приоритетной областью применения этого метода стала фармацевтическая промышленность. Сам метод определения бактериальных эндотоксинов, получивший название – ЛАЛ-тест, в настоящее время является фармакопейным, и, за редким исключением, заменил альтернативный ему метод - определение пирогенов на кроликах путем регистрации повышения температуры в ответ на внутривенное введение испытуемых препаратов.

Внедрение ЛАЛ-теста позволило контролировать на пирогены препараты снотворно-

го действия, анальгетики, вещества для наркоза, наркотические вещества, миорелаксанты, короткоживущие радиофармацевтические препараты, а также лекарственные вещества на различных стадиях технологического процесса. Замена теста на пирогены альтернативным ему — определением в препарате эндотоксинов — тем более оправдана, так как доказана более низкая чувствительность кроликов по сравнению с человеком к пирогенам [2]. Так, у человека повышение температуры тела наблюдается при внутривенном введении 4-8 ЭЕ/кг (ЭЕ - эндотоксиновые единицы), у кролика 10-15 ЭЕ/кг [3].

#### *ЛАЛ — тест в контроле технологического процесса*

За рубежом фармацевтическая промышленность широко использует ЛАЛ-тест не только для контроля готовой продукции, но также для контроля технологического процесса. ЛАЛ-тест - на сегодняшний день единственный способ максимально быстро провести постадийный контроль производства инъекционных препаратов. Наиболее рационально в этом случае проводить «ЛАЛ-контроль» таких этапов производства:

- контроль сырья;
- контроль воды для инъекций;
- проверка элементов фильтра на вымывание из них пирогенов;
- контроль растворов перед стерилизующим фильтрованием;
- контроль чистоты ампул и флаконов.

ЛАЛ-тест может с успехом использоваться для определения оптимальных режимов мойки ампул и флаконов в моечных машинах, дает возможность проконтролировать и определить наилучший режим термической депирогенизации.

Методики проведения ЛАЛ-теста, а также пределы содержания эндотоксинов в случае контроля технологического процесса не регламентируются Фармакопеями, а определяются самими заводами-производителями, поэтому внедрение ЛАЛ-методик на производстве не требует длительного времени и позволяет повысить качество лекарственных средств.

Иные подходы к контролю с помощью ЛАЛ-теста готовых лекарственных средств. В настоящее время только несколько предприятий Украины включили в АНД на некоторые из выпускаемых препаратов раздел «Бактериальные эндотоксины»: ЗАО «Индар», «Фармацевтическая компания «Здоровье»,

ХГФП «Здоровье народу», Фармацевтическая фирма «Дарница». Введение ЛАЛ-теста позволило сотрудникам ОТК, во-первых, достаточно быстро (в течение 1.5 ч) получать результат испытания, во-вторых, в случае повышения «пирогенной загрязненности» препарата, иметь об этом информацию задолго до того, как препарат по этому показателю необходимо будет браковать, позволяет вовремя провести внутризаводские мероприятия, способствующие повышению качества продукции.

Нерешительность большинства отечественных заводов в отношении введения ЛАЛ-теста, возможно, объясняется как экономическими причинами (необходимостью приобретать реактивы, посуду и обучить сотрудников), так и некоторыми сомнениями в качестве выпускаемой продукции. Однако, результаты наших исследований отечественного препарата «Вода для инъекций в ампулах» показывают, что содержание бактериальных эндотоксинов в нем не только не превышает, но и значительно ниже уровня, принятого в международной практике (Табл. 1).

Таким образом, отечественные производители уже в настоящее время способны обеспечить необходимое по уровню содержания бактериальных эндотоксинов качество препаратов.

Таблица 1

#### **Уровень содержания бактериальных эндотоксинов в препарате «Вода для инъекций» отечественных производителей\***

Производитель	Содержание эндотоксинов, ЭЕ/мл	Требования USP 24, ЕФ 2002, ЭЕ/мл
ФФ «Дарница»	< 0.031	< 0.25
ОАО «Днепрофарм»	< 0.031	

*Примечание.* \*Согласно исследованиям, проведенным в лаборатории фармакопейного анализа ГП «НЭФЦ»

#### *В каких случаях необходима замена теста «Пирогенность» на ЛАЛ-тест?*

Вопрос необходимости замены теста «Пирогенность» на ЛАЛ-тест, в первую очередь, касается парентеральных лекарственных средств, введение которых кролику невозможно или нецелесообразно:

- инфузионные препараты, вводимые человеку в дозе более 700 мл/ч (Максимальный объем при внутривенном введении кролику — 10 мл, что не позволяет оценить реакцию человека на введение данного препарата в

предписанном объеме.) Проведение теста на «пирогены» в этом случае не корректно.

- препараты-антипиретики, обладающие гипотермическими свойствами и, в связи с этим, «маскирующие» действие пирогенов (например, галоперидол, диклофенак натрия).

- препараты, фармакологические свойства которых делают невозможным их введение кролику в необходимом объеме: миорелаксанты, средства для наркоза (например, кетамин) и др.

В США и других странах после включения раздела «Бактериальные эндотоксины» в национальные Фармакопеи разработка ЛАЛ-теста для конкретных препаратов велась в одинаковой очередности: в первую очередь, для воды и радиофармацевтических препаратов, затем для препаратов, которые нельзя испытывать на кроликах (наркотики, миорелаксанты, седативные средства, средства, обладающие гипотермической активностью и др.) и т.д.

Для фармацевтического предприятий экономически выгодно заменить также тест на кроликах определением бактериальных эндотоксинов для таких препаратов, введение которых кролику резко ограничивает возможность его дальнейшего использования (препараты антигенной природы, препараты крови). Например, причиной гибели кроликов при введении им большинства антибиотиков является действие большой дозы антибиотика на ферменты микрофлоры и, как следствие этого, дисбактериоз или, как при введении линкомицина гидрохлорида, кандидомикоз.

#### *Цель предварительных экспериментальных исследований — показать возможность применения ЛАЛ-теста для данного препарата*

На фармацевтических предприятиях серийному контролю препарата на содержание бактериальных эндотоксинов должны предшествовать, говоря языком Европейской Фармакопеи — «preliminary test» [4] - предварительные экспериментальные исследования, цель которых показать возможность применения ЛАЛ-теста для данного препарата. Когда мы пишем «для данного препарата» имеется в виду не только состав препарата, но и конкретная технология его производства на конкретном предприятии. Компетентно выполненные предварительные экспериментальные исследования позволяют дать исчер-

пывающие ответы на целый ряд вопросов, которые обязательно возникнут у аналитика при проведении серийного контроля. Вот только некоторые из них (пути решения этих вопросов будут рассмотрены в следующих публикациях):

- каким из фармакопейных методов предпочтительнее определять эндотоксины в препарате;

- обладает ли препарат свойством ингибировать или, наоборот, усиливать реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксинами;

- как, если необходимо, устранить в препарате мешающие факторы, способные искажать реакцию между эндотоксинами и лизатом;

- какой чувствительности ЛАЛ-реактив использовать при проведении теста;

- какое «рабочее» разведение препарата выбрать;

- какова предельная концентрация эндотоксинов (ПКЭ) для данного препарата.

Точно определить ПКЭ для препарата крайне важно, так как этот показатель включается в АНД. ПКЭ является величиной расчетной, и чтобы рассчитать величину ПКЭ для конкретного препарата, необходимо знать максимальную дозу эндотоксина, которую пациент может получить при введении препарата надлежащим путем без какого-либо неблагоприятного эффекта, и максимальную дозу этого препарата для человека в час [4-6].

Пределы содержания эндотоксинов для многих лекарственных средств (готовых лекарственных средств, субстанций) указаны в зарубежных Фармакопеях [4,5].

Однако простая задача — вычислить ПКЭ по формуле и уточнить полученную величину в различных Фармакопеях - простая только на первый взгляд. Специалисты по ЛАЛ-тесту за рубежом рекомендуют проверить также справочники и клинические публикации, уточнив, имеются ли режимы дозировок, превышающие максимальную дозу, указанную в инструкции на данный препарат. Если обнаружены различия как в дозировании препарата, так и в величине ПКЭ в различных Фармакопеях, по мнению зарубежных специалистов, следует утвердить самый минимальный предел содержания эндотоксинов для препарата как наиболее безопасный для человека. При этом, конечно, следует учитывать, что все различия в применении пре-

парата должны касаться одной рыночной зоны [7].

- следует ли перед тем, как испытывать препарат в ЛАЛ-тесте, проводить коррекцию его рН, и как это сделать;

Изучение условий коррекции рН испытуемого образца – существенная часть процесса валидации ЛАЛ-методики для препаратов, содержащих буфер, или имеющих значения рН, отличные от нейтрального.

В качестве примера посмотрим результаты изучения рН двух препаратов - антибактериального средства и средства для местной анестезии (Табл. 2).

Как видно из данных, представленных в Табл. 2, разведение препаратов А и В позволило скорректировать рН исследуемых образцов, не используя буфер, щелочь или кислоту.

Однако далеко не всегда разведение препарата позволяет решить проблему подготовки рабочего образца к методике-ЛАЛ. Например, для лекарственных средств, содержащих ЭДТА и цитрат, фирмы - поставщики ЛАЛ-реактива разработали специальный буфер. Многие препараты требуют не только наличия буфера, но и введение до нейтрализации специальных добавок [7,8].

Практика показывает, что при отсутствии таких исследований возможно получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов. В случае контроля препарата ложноположительный результат подразумевает выбраковку препарата хорошего качества, ложноотрицательный – введение пациенту пирогенного препарата.

Таблица 2

**Результаты изучения профиля рН препаратов в ЛАЛ-тесте**

Титр разведения препарата	рН образца (препарат)	рН образца (препарат + ЛАЛ-реактив)	Заключение
<i>Препарат А (антибактериальное средство)*</i>			
1:2	10.1	8.5	Не соответствует
1:10	9.0	7.6	Соответствует USP 24
1:100	8.3	7.2	Соответствует USP 24 Рекомендован в АНД
1:1000	7,5	7.0	Соответствует ЕФ 97
<i>Препарат В (местный анестетик)**</i>			
1:1	6.1	5.9	Не соответствует
1:100	6.4	6.2	Соответствует USP 24
1:1000	6.6	6.5	Соответствует USP 24 и ЕФ 97 Рекомендован в АНД

Примечания:

\*- данные Dr. James F. Cooper, получены с использованием ЛАЛ-реактива Endosafe Т;

\*\* - данные лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ, получены с использованием ЛАЛ-реактива - PyrotelO-T.

Очень часто приходится сталкиваться с тем, что причина «ложных» результатов кроется в природе самого лекарственного средства. В препарате могут содержаться вещества, вызывающие, подобно эндотоксину, образование геля. К таким веществам, вызывающим неспецифическое гелирование, можно отнести некоторые противоопухолевые препараты - полисахариды (например, карбоксиметилированный глюкан), полинуклеотиды (сополимер полирибоинозиновой кислоты с полирибозитидиловой) и др. (Табл. 3) [9-14].

Таблица 3

**Вещества – ингибиторы и активаторы реакции образования тромба**

Ингибиторы	Активаторы
антитромбин III	трипсин
диизопропилфторфосфат	тромбин
$\alpha$ - антиплазмин	тромбопластин
бензамидин	избыток $Ca^{+2}$ , $Mn^{+2}$ , $Mg^{+2}$
леупептин	полисахариды
диметилсульфоксид	полинуклеотиды
мочевина	простые сахара
натрия хлорид	пептидоглюканы
антикоагулянты (в препаратах, полученных из крови, плазмы или сыворотки)	ферменты
антибиотики	липоевая кислота
гормоны	глюканы
алкалоиды	
цитрат	

Как правило, итогом длительной и методически сложной экспериментальной работы по валидации ЛАЛ-теста для конкретного



препарата является методика, выполнение которой быстро и с приобретением аналитиком определенных навыков — несложно. Однако, изменение фирмы-производителя ЛАЛ-реактива, необходимого для проведения ЛАЛ-теста, повлечет за собой необходимость повторить исследования по валидации ЛАЛ-теста [6]. Чем это объясняется? От рецептуры ЛАЛ-реактива и химического состава испытуемого препарата зависит, в каких условиях будет протекать реакция с пирогенами (эндотоксинами), и, следовательно, они определяют ход валидационных исследований.

ЛАЛ-реактив, произведенный различными фирмами, отличается по составу (содержание катионов, белка, буфера, поверхностно-активных веществ) и методу обработки реактива на стадии производства [7]. В том случае, если испытуемый препарат представляет собой водный раствор с низкой концентрацией действующего вещества и нейтральным рН, как правило, он не оказывает существенного влияния на активность ЛАЛ-реактива и ведет себя сходно с ЛАЛ-реактивами различных поставщиков.

Однако, если препарат является многокомпонентным, имеет сложный состав вспомогательных веществ, содержит буфер, хелаторы металлов, компоненты, способные агрегировать эндотоксины, то опыт показывает, что с ЛАЛ-реактивами различного производства такой препарат будет реагировать по-разному [7]. Таким образом, требование обязательной валидации методики-ЛАЛ для конкретного препарата при изменении фирмы-производителя лизата амебоцитов является оправданным.

О том, как проводить валидацию методики-ЛАЛ и многие другие вопросы, поставленные в этой статье будут рассмотрены нами в дальнейших публикациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bang F.B. // Bull. John. Horkins Hosp. — 1956. — V. 98, No. 5. — P. 325-337.
2. Pearson F.C. Pyrogens. — New York: Marcel Dekker Inc., 1985.
3. Hochstein H.D. // Pharmaceutical Technology. — 1987. — V. II, No. 6. — P. 158-163.
4. 2.6.14. Bacterial Endotoxins // European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> Ed. — 2002 — P. 145-147.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — С. 127-138.
6. (85) Bacterial Endotoxins Test // The United States Pharmacopoeia (USP-24). — 2000. - P.1828-1831.
7. Cooper J. F. Validation of bacterial endotoxin test methods // LAL Times. - 1999. — V. 6, No. 2. — P. 1-5.
8. Cooper J. F. LAL interference screening of in-process

- materials and finished products // LAL Times. - 1998. — V. 5, No. 1. — P. 1-5.
9. Ситников А. Г., Травина Л.А., Кивман Г.Я. и др. ЛАЛ-тест: механизмы реакции, использование, перспективы развития // Лекарственные средства. Экономика, технология и перспективы развития: Обзор. информ. — М.: ВНИИСЭНТИ, 1989. — Вып. 3. — 44 с.
10. Kakinuma A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1981. — V. 101, No. 2. — P. 434-439.
11. Elin R. J., Wolff S. M. // J. Infect. Dis. — 1973. — V. 128, No. 3. — P. 349-352.
12. Elin R. J., Utter A.E. // J. Clin. Microbiol. — 1980. — V. 12, No. 4. — P. 502-505.
13. Novitsky T. "Dear LAL User..."// LAL Update. — 1990. - V. 8, No. 2, - P. 1
14. Novitsky T. Reactivity of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) to glucans //LAL Update. - 1990. - V. 8, No. 2. - P. 2-3.

Резюме

Меркулова Ю.В., Гомон О.М., Чайка Л.О., Хованська Н.П.

**Визначення вмісту бактеріальних ендотоксинів (ЛАЛ-тест) – фармакопейний метод. Повідомлення 1.**

Стаття присвячена одному з методів біологічного контролю лікарських засобів на пірогени — ЛАЛ-тесту (метод визначення вмісту бактеріальних ендотоксинів). Розглядаються різні аспекти використання ЛАЛ-тесту на фармацевтичних підприємствах, обговорюється доцільність заміни тесту "Пірогенність" на ЛАЛ-тест при контролі якості ін'єкційних препаратів, аналізується мета і завдання експериментальних досліджень на етапі розробки і валидації методу визначення бактеріальних ендотоксинів у конкретному препараті.

Summary

Merkulova Yu.V., Gomon O.N., Chaika L.A., Khovanskaya N.P.

**Determination of bacterial endotoxin content (LAL test) - Pharmacopoeial method. Report 1.**

This article is devoted to one of drug biological methods control for pyrogens - the LAL test (method of bacterial endotoxin content determination). The various aspects of LAL test using at pharmaceutical plants are considered, the advisability of pyrogen test replacement with LAL test when controlling the injection drugs quality is discussed, the purpose and objective of experimental study at the stage of development and validation of bacterial endotoxin determination method in individual drug were analyzed.

**Меркулова Юлія Вагімовна.** Окончила Харківський державний університет (1983). Работает в ГНЦАС (с 1993). Науч. сотр. лаборатории общей фармакологии.

**Гомон Ольга Николаевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1979). Работает в ГНЦАС. Ст. науч. сотр. лаборатории общей фармакологии. Канд. биол. наук (1997).

**Чайка Леонид Александрович** (р.1942). Окончил Харьковский медицинский институт. Работает в ГНЦАС (с 1968). Зав. лабораторией общей фармакологии (1991). Канд. мед. наук (1981).

**Хованская Наталья Петровна.** Окончила Харьковский государственный университет. Работает в ГНЦАС (с 1970). Зав. лабораторией фармакопейного анализа ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр". Канд. фарм. наук (1992).

УДК 543.544.615.01

Гризодуб А.И.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ

Доклад на информационно-методическом семинаре  
«Валидация методик анализа лекарственных средств», Киев, 12-13 марта 2002 года

Рассмотрены вопросы валидации спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств (ЛС) в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ). Основное внимание уделено критериям приемлемости валидационных характеристик и прогнозу погрешности анализа в своей лаборатории и других лабораториях, удовлетворяющих требованиям ГФУ.

### 1. Введение

С 1 октября 2001 года введена в действие Государственная Фармакопея Украины 1 издания (ГФУ) [1]. В ней представлена общая статья «Валидация аналитических методик и испытаний» (далее — «Валидация»), в соответствии с которой все методики, включаемые в аналитическую нормативную документацию (АНД), должны быть валидированы. В этой общей статье изложены основные принципы валидации, однако непонятно, как проводить валидацию в каждом конкретном случае и какими критериями при этом руководствоваться. Не описаны эти подходы и в других Фармакопеях, а также в Технических руководствах (ТР) (в частности, в [2]). Это затрудняет практическое применение статьи «Валидация».

Целью данной работы является попытка прояснить проблемы валидации одного из самых распространенных фармакопейных методов количественного анализа — спектрофотометрического (СФ). Приведенные подходы относятся, прежде всего, к разделу АНД «Количественное определение». В значительной степени они применимы также к разделам «Растворение» и «Однородность дозирования».

### 2. Основные задачи валидации методик количественного определения

*Валидация аналитической методики* — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач ([1]).

При валидации методики контроля качества, включаемой в АНД на лекарственное средство (ЛС), в условиях Украины необходимо решать следующие задачи:

1. Необходимо доказать, что методика позволяет контролировать качество данного ЛС

на оборудовании и в условиях данной лаборатории.

2. АНД утверждается приказом Министерства здравоохранения, т.е. является государственным документом. Поэтому необходимо доказать, что методика позволяет контролировать качество данного ЛС в любой другой лаборатории (в частности, в аккредитованной лаборатории системы Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств) на любом другом оборудовании, при условии, что оно отвечает требованиям Фармакопеи и/или дополнительным требованиям АНД.

### 3. Фармакопейные методы СФ-анализа

В общей статье ГФУ «2.2.25. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» [1] («Спектрофотометрия») описаны такие методики количественного однокомпонентного СФ-анализа:

Однокомпонентный анализ

$$\text{Метод стандарта (МС)} \quad x = \frac{c}{c_{st}} = \frac{A}{A_{st}} \quad (1)$$

Метод показателя

$$\text{поглощения (МПП)} \quad c = \frac{A}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (2)$$

где:  $c$  — концентрация;

$A$  — оптическая плотность;

индекс «st» указывает на раствор сравнения;

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения.

Основным является МС, МПП применяется в исключительных случаях [1].

Для многокомпонентной спектрофотометрии описано несколько методов, из которых главным является модифицированный метод наименьших квадратов (ММНК). Применяет-

ся также иногда и обычный метод наименьших квадратов (МНК):

Многокомпонентный анализ

$$\text{МНК} \quad c_k = \sum_{i=1}^n a_{ki}^{\text{МНК}} \cdot A_i, \quad k=1..m. \quad (3)$$

$$\text{ММНК} \quad X_k = \frac{c_k}{c_k^{\text{ст}}} = \sum_{i=1}^n a_{ki}^{\text{ММНК}} \cdot d_i, \quad i=1..n, \quad (4)$$

$$d_i = \frac{A_i}{A_i^{\text{ст}}}$$

где:

$a^{\text{МНК}}$  – расчетные коэффициенты МНК;

$a^{\text{ММНК}}$  – расчетные коэффициенты ММНК [1].

Другие методы (относительный метод наименьших квадратов, производная спектроскопия) применяются гораздо реже, поэтому рассматриваться далее не будут.

#### 4. Корректность методик количественного определения

Методику, позволяющую контролировать качество ЛС, будем далее называть «корректной», а не позволяющую – «некорректной».

Как определить, что методика корректна?

Например, при проведении валидации СФ-методики количественного определения амброксола в сиропе нашли, что методика характеризуется относительной погрешностью  $\Delta_{As} = 2\%$ . Это хорошо или плохо? Позволяет ли такая точность контролировать качество данного ЛС? Интуитивно чувствуем, что для субстанции амброксола (99-101 %) точность недостаточна, а для сиропа (90-110 %) приемлема. Но где критерии?

Другой пример. При изучении линейности нашли, что зависимость оптической плотности (A) от концентрации характеризуется уравнением  $A = k \cdot C + b$ . При этом  $b = 0.05$  при стандартном отклонении 0.01, т.е. прямая явно не проходит через нуль. Возможно ли при такой величине  $b$  проводить количественное СФ определение методом стандарта? А если нет, то при каком  $b$  можно?

Наконец, позволяет ли наше оборудование получить необходимую нам точность (например, 2 %)?

Как видно, невозможно оценить корректность методики и провести квалификацию оборудования, не имея критериев этой корректности. Однако в общей статье ГФУ «Валидация», а также в других Фармакопеях и ТР ничего не говорится об этих критериях.

В последние годы этот вопрос стал волновать и Европейскую Фармакопею. Был опубликован ряд статей [3-5], в которых точность методик количественного определения субстанций увязывалась с допусками содержания основного вещества. Однако по готовым ЛС (ГЛС) никаких исследований ими не проводилось.

Вопросы корректности методик количественного анализа ЛС (субстанций и ГЛС) были достаточно подробно рассмотрены нами в предыдущих публикациях [6-9]. Нами были теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены следующие критерии корректности методик количественного определения.

#### 5. Критерии корректности методик количественного определения

При валидации необходимо знать не только реальную полную погрешность анализа, но и максимальную погрешность, допускаемую данным типом оборудования (согласно его спецификации). Эту полную погрешность называют неопределенностью [13].

Между относительной неопределенностью результатов количественного определения ( $\Delta_{As} \%$ ) и относительным допуском содержания анализируемого компонента ГЛС (В%) или верхним допуском содержания основного компонента в субстанции ( $B_{\text{upper}} \%$ ) действительны соотношения [8-9]:

$$\text{Субстанции} \quad \Delta_{As} \leq B_{\text{upper}} \quad (5)$$

$$\text{ГЛС} \quad \Delta_{As} \leq 0.32 \cdot B \quad (6)$$

Например, для субстанции амброксола (99-101%)  $\Delta_{As} \leq 1\%$ , а для сиропа амброксола (90-110%)  $\Delta_{As} \leq 3.2\%$ . Таким образом, относительная погрешность методики количественного определения  $\Delta_{As} = 2\%$  при анализе субстанции амброксола ( $B_{\text{upper}} = 1\%$ ) не позволяет, а при анализе сиропа ( $B = 10\%$ ) позволяет получить корректные результаты.

В некоторых случаях приходится мириться с систематической погрешностью, например, завышением результатов СФ-анализа за счет фонового поглощения сопутствующих веществ. Общая статья ГФУ «Спектрофотометрия» [1] рекомендует, чтобы эта систематическая погрешность  $\delta$  не превышала одной десятой допусков, т.е.

$$\delta \leq 0.1 \cdot B. \quad (7)$$

В этом случае систематическая погрешность не сказывается значительно на общей погрешности анализа [9].

### 6. Прогноз неопределенности СФ анализа

Как видно, в критерии (5-6) входит неопределенность анализа (как на оборудовании своей лаборатории, так и на другом оборудовании, отвечающем требованиям ГФУ [1]), поэтому без прогноза этой неопределенности использование критериев невозможно. Невозможно и проведение квалификации оборудования, поскольку нельзя сформулировать критерии пригодности этого оборудования.

Прогноз неопределенности СФ-анализа подробно изложен в [8, 12], а также в общей статье ГФУ [1] «Спектрофотометрия». Основные расчетные уравнения можно представить следующим образом:

Однокомпонентный анализ

$$\underline{\text{МПП}} \quad \Delta_{As}^2 = \Delta_{E,r}^2 + \Delta_{sp,r}^2 + \Delta_{V,r}^2 \quad (8)$$

$$\underline{\text{МС}} \quad \Delta_{As}^2 = 2 \cdot (\Delta_{sp,r}^2 + \Delta_{V,r}^2) \quad (9)$$

$$\Delta_{sp,r} = 2 \cdot S_{sp,r} \quad (10)$$

$$S_{sp,r}^2 = S_{A,r}^2 + S_{cell,r}^2 \quad (11)$$

Многокомпонентный анализ

$$\underline{\text{МНК}} \quad \Delta_{As,k}^2 = (K_k^{\text{МНК}})^2 \cdot (\Delta_{E,r}^2 + \Delta_{sp,r}^2) + \Delta_{V,r}^2 \quad (12)$$

$$\underline{\text{ММНК}} \quad \Delta_{As,k}^2 = 2 \cdot [(K_k^{\text{ММНК}})^2 \cdot \Delta_{sp,r}^2 + \Delta_{V,r}^2] \quad (13)$$

где:

$S_{A,r}$  - относительное стандартное отклонение сходимости оптической плотности на спектрофотометре;

$S_{cell,r}$  - относительное стандартное отклонение сходимости кюветной погрешности на спектрофотометре;

$\Delta_{E,r}$  - относительная неопределенность правильности оптической плотности на спектрофотометре;

$\Delta_{V,r}$  - относительная неопределенность погрешности приготовления растворов, рассчитываемая для каждой конкретной методики;

$k$  - указывает на  $k$ -ый компонент анализируемой смеси;

$K^{\text{МНК}}$  - коэффициент усиления погрешности МНК;

$K^{\text{ММНК}}$  - коэффициент усиления погрешности ММНК.

Величины  $S_{A,r}$ ,  $S_{cell,r}$ ,  $\Delta_{E,r}$  и  $\Delta_{V,r}$  в зависимости от задачи, могут выражаться как в долях от 1, так и в %.

### 7. Квалификация оборудования

Как видно, в уравнения (8-13) входят эксплуатационные характеристики оборудования, без которых невозможно проведение прогноза неопределенности анализа. Обоснование требований к этим характеристикам и выбор на основе их оборудования проводится на стадии квалификации используемого оборудования (имеется в виду Design Qualification (DQ) [10]). DQ должна обосновать – в состоянии ли оборудование обеспечить выполнение поставленных задач. Основным критерием пригодности оборудования для СФ анализа является соответствие его требованиям ГФУ [1], прежде всего, статье «Спектрофотометрия», а также требованиям соответствующих ТР Европейской Фармакопеи (ЕФ). В большинстве случаев этих требований достаточно.

#### 7.1. Требования к мерной посуде

Очевидно, что с плохой мерной посудой не получишь точных результатов. Требования к мерным колбам не приведены в ГФУ, однако они описаны в ТР ЕФ [2]. Поскольку ГФУ опирается на ЕФ, а ЕФ на данное Руководство, то требования к мерным колбам должны соответствовать этому Руководству. Требования к пипеткам отсутствуют в [2], поэтому пипетки должны соответствовать ГОСТ 29227-91 [11].

Таблица 1

#### Требования к мерной посуде

Колбы [2]		Пипетки [11]	
объем колбы	неопределенность, % ( $\Delta_b$ )	объем пипетки	неопределенность, % ( $\Delta_p$ )
10 мл	0.50	0.5	1.0
25 мл	0.23	1.0	0.6
50 мл	0.17	2.0	0.5
100 мл	0.12	5.0	0.6
250 мл	0.08	10.0	0.5
500 мл	0.07	25.0	0.4

Из Табл. 1 видно, что при объеме колбы более 50 мл неопределенность пробоподготовки определяется, в основном, неопределенностью пипетки, которая для объемов 1-10 мл примерно одинакова.

Величины  $\Delta_{V,r}$  в соотношениях (9-13) рассчитываются на основе данных Табл. 1 для каждой конкретной методики анализа [8].

#### 7.2. Квалификация спектрофотометра

Фармакопеи, вообще, и ГФУ, в частности, не регламентируют величину сходимости оптической плотности  $S_{A,r}$ , а только ее правиль-

Таблица 2

Требования к спектрофотометру

Характеристика	Требования ГФУ
Спектральный диапазон	200 – 800 нм
Правильность шкалы длин волн	$\pm 1$ нм для УФ и $\pm 3$ нм для видимой области
Правильность оптической плотности $A(\Delta_{E,r})$	1.3% (235 нм), 1.2% (257 нм), 3.4% (313 нм), 1.6% (350 нм)
Граничный уровень рассеянного света	$A_{200\text{нм}}$ (кювета 1 см) > 2
Разрешающая способность	Отношение $A_{269}/A_{266}$ регламентируется АНД
Кюветы	Вариация толщины слоя менее $\pm 0.005$ см
<i>Дополнительные требования</i>	
$S_{A,r}$	$\leq 0.1-0.2\%$
$S_{cell,r}$	$\leq 0.1\%$
$S_{sp,r}$	$\leq 0.25\%$

ность  $\Delta_{E,r}$ . Но правильность оптической плотности важна только при количественном анализе методом показателя поглощения (см. соотношение (8)). В случае же самого распространенного – метода стандарта – важна именно  $S_{A,r}$  (см. соотношение (9)). Поэтому в Табл. 2 добавлены требования к  $S_{A,r}$ , а также к относительному стандартному отклонению кюветной невоспроизводимости  $S_{cell,r}$ , хотя эти требования отсутствуют в ГФУ. Без этих величин невозможно провести оценку неопределенности результатов методики анализа (соотношения (8-13)), а, следовательно, и корректно провести валидацию. Указанные величины характерны для современных приборов, в частности, HP 8453 UV-VIS, а также «Spectrum M-40».

Величина  $S_{A,r}$  обычно указывается в спецификации к прибору.

К сожалению, величина  $S_{cell,r}$  при этом обычно не приводится, хотя для некоторых приборов она может быть очень значительной (например, для СФ-16 она достигает 0.35 %), что существенно увеличивает погрешность СФ-анализа, особенно многоволнового [12]. Поэтому целесообразно для своего спектрофотометра определить суммарную спектрофотометрическую погрешность  $S_{sp,r}$  определяя, например, стандартное отклонение оптической плотности  $A$  фармакопейного раствора калия дихромата при длине волны 257 нм по 30 измерениям с *выниманием* кюветы. Для хороших приборов обычно величина  $S_{sp,r} \leq 0.1$  %.

Сравнение соотношений (5-6, 8) и величин  $\Delta_{E,r}$  из Табл. 2 показывает, что МПП применим обычно только для ГЛС при  $B > 10$  %. На это и указывается в общей статье ГФУ «Спектрофотометрия» [1].

Соответственно, многокомпонентный МНК (уравнение (3)) применим только при  $B > 10$  % и  $K^{МНК} < 1$ . Учитывая, что для многокомпонентной СФ характерны величины коэффициентов усиления  $K = 5-10$  [1, «Спектрофотометрия»], то ясно, что МНК не применим к анализу ЛС, как и указано в ГФУ [1].

Уравнения (5-6, 8-13) и данные Табл. 1 позволяют оценить требования к величинам  $S_{sp,r}$  в случае обычного однокомпонентного МС (уравнение (1)).

Полагая, что  $B = 5$  % (минимальный допуск для ГЛС) и что при пробоподготовке используется пипетка объемом 1 мл и колба объемом 100 мл, из уравнений (6) и (9-10) получим  $S_{sp,r} < 0.52$  %  $\approx 0.5$  %. Таким требованиям удовлетворяет даже СФ-16 [12]. Таким образом, для однокомпонентной СФ с помощью МС достаточно возможностей любого спектрофотометра. Использование для нивелирования фона двухволновой СФ (распространенный прием при фоновом поглощении основы) повышает погрешность примерно в 2 раза. Соответственно, величина  $S_{sp,r}$  должна быть меньше в 2 раза, т.е.  $S_{sp,r} < 0.25$  %, что и отражено в Табл. 2.

В случае многокомпонентной СФ с помощью ММНК (уравнение (4)) погрешность анализа больше, поэтому обычно  $B = 10$  %. Полагая ту же пробоподготовку и  $K^{ММНК} = 5$  и 10 (ГФУ, «Спектрофотометрия» [1]), из уравнений (6, 13) получим  $S_{sp,r} < 0.22$  % для  $K^{ММНК} = 5$  и  $S_{sp,r} < 0.11$  % для  $K^{ММНК} = 10$ . Возможности современных спектрофотометров ( $S_{sp,r} < 0.1$  %) как раз позволяют провести такой анализ, что и отражено в требованиях ГФУ ( $K^{ММНК} = 5-10$ ). Используя технику повторных измерений [12], можно работать и при больших  $S_{sp,r}$  однако, даже при числе повторов 5 (с рандомизацией положения кювет)

величина  $S_{sp,r}$  не должна превышать 0.25 %, что и отражено в Табл. 2.

#### Краткие выводы по квалификации

Спектрофотометры и мерная посуда в конкретной лаборатории могут быть гораздо более высокого уровня. Поэтому следует особо подчеркнуть, что при прогнозе неопределенности результатов (см. ниже) следует опираться именно на величины, приведенные в Табл. 1 и 2, поскольку они являются *допустимыми*. Это означает, что прогноз неопределенности результатов и валидация, основанные только на возможностях своего (нередко высокого класса) оборудования, некорректны, поскольку в другой лаборатории (в частности, в контрольной), где оборудование может быть классом ниже, но соответствующее ГФУ, могут получиться совсем другие результаты.

#### 8. Валидационные характеристики, требуемые ГФУ для методик количественного определения

Таблица 3

##### Валидационные характеристики методик количественного определения

Характеристики	Требуется (+), не требуется (-)
Правильность	+
Точность:	
сходимость	+
внутрилабораторная точность	+
Специфичность	+
Линейность (в рамках диапазона применения)	+
Диапазон применения	+
Робастность (на стадии разработки)	+

#### 8.1. Специфичность

Необходимо доказать, что используемая СФ-методика количественного определения позволяет контролировать содержание именно анализируемого вещества.

Рассмотрим простейший пример – количественный СФ-анализ по собственному поглощению при одной аналитической длине волны (АДВ). При данной АДВ оптическое поглощение могут иметь и другие вещества (технологические примеси, продукты разложения, вспомогательные вещества), завышая результаты анализа. Если содержание этих веществ (назовем их примесями) не регламентируется, то количественный СФ-анализ не является специфичным. Поэтому применение СФ-анализа для количественного оп-

ределения должно сопровождаться контролем примесей другими методами (обычно ТСХ). В этом случае СФ-методика является вполне специфичной.

Таким образом, доказательство специфичности в случае СФ-анализа сводится к доказательству того, что оптическое поглощение (или содержание) всех возможных примесей регламентируется в допустимых пределах.

Общая статья 2.2.25 ГФУ [1] рекомендует, чтобы это поглощение не превосходило 10 % допуска содержания (В) анализируемого компонента.

#### 8.2. Диапазон применения

В соответствии с требованиями общей статьи ГФУ «Валидация», валидация методики проводится в таком диапазоне концентраций:

- количественное определение – 80-120% от номинала;
- однородность дозирования – 70-130% от номинала;
- растворение -  $\pm 20\%$  нормируемой величины.

Каким же оптическим плотностям (А) это соответствует? Ранее считалось, что оптимальный интервал  $A = 0.3 - 0.8$  [8]. Это было связано с высоким уровнем рассеянного света, в связи с чем спектрофотометры обычно не могли обеспечить точное измерение при  $A > 1$ . Однако современные спектрофотометры имеют такой низкий уровень рассеянного света, что обеспечивают измерение оптической плотности до  $A = 4$  и выше. Более высокие А обеспечивают меньшую зависимость от кюветной погрешности, предъявляют меньшие требования к квалификации аналитика, линейности калибровочного графика и т.д. В связи с этим, оптимальный диапазон все время смещается в сторону больших А. В частности, современные спектрофотометры обычно регламентируют сходимость оптической плотности ( $S_{A,r}$ ) при  $A = 1$ . Поэтому в ГФУ (и в других Фармакопеях) не приводится оптимальный интервал оптических плотностей. Можно говорить только об ограничении величины А снизу, но не сверху. В частности, величина  $S_{A,r}$  на "Specord M-40" во всем интервале длин волн 230-360 нм и оптических плотностей  $A = 0.5-1.5$  примерно постоянна и равна  $\approx 0.2\%$  [12]. Поэтому можно рекомендовать номинальное значение оптической плотности  $A_{st} \approx 0.6$ . Желательно, чтобы  $A > 0.4$ .

8.3. Линейность

Зависимость оптической плотности (A) от концентрации (C) должна иметь линейный вид:

$$A = k \cdot c + b \tag{14}$$

$r, S_{rest}, S_k, S_b$

$r$  – коэффициент корреляции,  $S_{rest}$  – остаточное стандартное отклонение точек вокруг прямой,  $S_k$  и  $S_b$  – стандартные отклонения для  $k$  и  $b$ .

Какими должны быть эти величины?

Ранее СФ количественное определение проводилось методом калибровочного графика (МКГ). В этом случае величина  $S_{rest}$  характеризовала погрешность методики. Калибровочный график для такого случая должен строиться по 5 независимым концентрациям (т.е. приготовленным из 5 разных навесок) – 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % к номинальной (в случае однородности дозирования – 70 %, 85 %, 100 %, 115 %, 130 %).

Однако ситуация изменилась, и МКГ, в силу своей низкой точности, даже не внесен в общую статью ГФУ «Спектрофотометрия» [1]. Фармакопейными являются метод показателя поглощения (МПП) и метод стандарта (МС). Если линейность не выполняется, то МПП и МС не применимы. Поэтому необходимо продемонстрировать эту линейность.

Какие же возможные причины отклонения от линейности в случае спектрофотометрии? Главными являются две – влияние рассеянного света и химические процессы (ассоциация, разложение и т.д.). Если, например, уровень рассеянного света равен 1 %, то оптическую плотность выше 2 получить нельзя в принципе. Соответственно, в этом случае после  $A = 1$  наблюдается изгибание калибровочного графика. Однако, как уже говорилось ранее, для современных приборов это неактуально – они позволяют получать  $A = 4$  и выше. Поэтому главными причинами нелинейности остаются химические. Следовательно, нам необходимо убедиться в незначимости этих факторов в диапазоне применения. Для этого 5 растворов (концентрации приведены выше) готовятся путем разбавления одного и того же раствора. Чтобы минимизировать погрешность пробоподготовки, лучше всего это делать весовым способом с соответствующим пересчетом. Полученный график необходимо привести, чтобы было видно отсутствие изгиба калибровочной прямой.

Каким же должны быть величины  $r$  и  $S_{rest}$ ? Поскольку точность проверяется другим способом, то каких-то особых требований к этим величинам нет. Если стандартное отклонение пробоподготовки  $S_{V,r} < 0.5\%$  (реальная величина),  $S_{sp} \leq 0.25\%$  (Табл. 2), то величина  $S_{rest}$  должна быть около 0.002 ед. А для номинальной  $A_{st} = 0.6$ . Можно показать, что в этом случае для интервала 80-120 % коэффициент корреляции  $r > 0.999$ . Для интервала 70-130 % он еще выше. Значительное отклонение величин  $r$  и  $S_{rest}$  от указанных величин может свидетельствовать как о неудовлетворительной пробоподготовке, так и об отклонениях от линейности.

8.3.1. Требования к b

МПП и МС применимы, строго говоря, только при прямо пропорциональной зависимости оптической плотности от концентрации:

$$A = k \cdot c \tag{15}$$

$r, S_{rest}, S_k$

Уравнение (14) переходит в (15) при  $b = 0$ . Реально на практике получается уравнение (14), однако величина  $b$  обычно незначимо отличается от нуля, например, при  $b < S_b$ .

В более сложных случаях для проверки значимости величины  $b$  необходимо обчислить экспериментальные точки по уравнению (15). Если при этом  $S_{rest}$  не вырастет по сравнению с уравнением (14), то величина  $b$  статистически неотличима от нуля, и калибровочной прямой является уравнение (15). В противном случае величина  $b$  является значимой, калибровочной прямой является уравнение (14), и необходимо доказать корректность получаемых с помощью МПП или МС результатов.

Свободный член  $b$  уравнения (14) вносит систематическую погрешность в результаты СФ-анализа. В случае МПП он завышает, а в случае МС – завышает (при  $A < A_{st}$ ) или занижает (при  $A > A_{st}$ ) результаты. С учетом уравнения (7) можно показать, что для получения корректных результатов должны выполняться соотношения:

МПП  $b \leq 0.1 \cdot B \cdot A_{st}$  (16)

В частности, при  $B = 0.1$  (т.е. 10 %),  $A_{st} = 0.6$  получим  $b < 0.006$ . Это достаточно жесткие ограничения.

МС  $b \leq \left| \frac{0.1 \cdot B \cdot A_{st}}{(1 - c/c_{st})} \right|$  (17)

В частности, при  $B = 0.1$  (т.е. 10%),  $c/c_{st} = 0.8$  (крайняя нижняя точка диапазона концентраций) и  $A_{st} = 0.6$  получим  $b < 0.030$ .

Из сравнения уравнений (16-17) видно, что МС, налагает, как минимум, в 5 раз менее жесткие требования на величину  $b$ , чем МПП.

#### 8.4. Сходимость

Общая статья ГФУ «Валидация» предлагает проверять сходимость результатов двумя способами, выполняя:

1) не менее 9 определений, охватывающих диапазон применения методики (три концентрации/три повтора);

2) не менее 6 определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

Из соотношения (17) видно, что второй способ в случае СФ-анализа с помощью МС **некорректен**, поскольку он не позволяет выделить систематическую погрешность при  $b \neq 0$ . Особенно некорректен он в многокомпонентном анализе, поскольку всегда будет показывать хорошие результаты, независимо от коэффициентов усиления погрешности. Для выявления погрешностей в случае МС концентрации модельных смесей должны обязательно отличаться от номинальных.

Поэтому следует использовать первый способ: из 3 навесок независимо готовятся 3 модельные смеси. Для каждой модельной смеси готовятся по 3 одинаковых параллельных разведения (всего 9). Измеряют оптические плотности всех 9 растворов при аналитической длине волны (АДВ). В случае МС параллельно измеряют оптическую плотность ( $A_{st}$ ) раствора сравнения. Из полученных величин рассчитывают концентрации ( $X_i$ ) в % к введенному. Находят среднее значение  $X$  и стандартное отклонение  $S_X$ , которое одновременно является и относительным стандартным отклонением  $S_{c,r}$ .

#### 9. Метрологические характеристики

Расчет и оценка метрологических характеристик преследует следующие цели:

1. Оценить сходимость результатов вокруг среднего.
2. Оценить значимость систематической погрешности.
3. Оценить суммарную погрешность и сравнить ее с критериями корректности методики.

Ниже предлагается рациональная схема расчета и оценки метрологических характе-

ристик. Преимуществом ее является то, что сразу рассчитываются относительные величины, минуя абсолютные, которые реально не используются. Возможны и другие подходы.

#### Сходимость результатов вокруг среднего

$$X_i (\%) = \frac{c_i}{c_{st,i}} \cdot 100 \quad (18)$$

$$\bar{X} (\%) = \frac{1}{9} \sum_{i=1}^{i=9} X_i \quad (19)$$

$$S_{C,r} (\%) = S_X (\%) = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=9} \frac{(X_i - \bar{X})^2}{8}} \quad (20)$$

$$\Delta X (\%) = t(95\%, 8) \cdot S_X = 2.31 \cdot S_X \quad (21)$$

#### Критерий значимости систематической погрешности

$$|\bar{X} - 100| \geq \Delta X \quad (22)$$

#### Величина систематической погрешности (при выполнении (22))

$$\delta (\%) = |\bar{X} - 100| \quad (23)$$

#### Оценка суммарной погрешности

$$S_{As} (\%) = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=9} \frac{(X_i - 100)^2}{9}} \quad (24)$$

$$\Delta_{As} (\%) = t(95\%, 9) \cdot S_{As} = 2.26 \cdot S_{As} \quad (25)$$

#### Оценка корректности методики

$$\text{Субстанции} \quad \Delta_{As} \leq B_{\text{upper}} \quad (26)$$

$$\text{ГЛС} \quad \Delta_{As} \leq 0.32 \cdot B \quad (27)$$

Отметим, что во всех случаях здесь рассчитываются метрологические характеристики единичного результата, а не среднего, поскольку нас интересует отклонение от истинного значения каждой отдельной концентрации.

Оценка сходимости результатов вокруг среднего преследует одну цель — оценить, имеется ли значимая систематическая погрешность (соотношение (22)). При выполнении (22) результаты отягощены систематической погрешностью (23).

Однако оценить корректность методики по этим величинам нельзя. Необходимо оце-



нить суммарную погрешность и сравнить ее с критериями корректности методики. Расчеты осуществляются по соотношениям (24-25), а оценка корректности – по соотношениям (26-27).

**Внутрилабораторная точность**

Данные исследования проводят на ЛС (субстанции или ГЛС), содержание анализируемого вещества в котором близко к номинальному. Из не менее 5 навесок одной серии ЛС готовят  $n \geq 5$  параллельных растворов. Готовят раствор сравнения, проводя, по возможности, ту же пробоподготовку, что и для исследуемого образца. Для каждого раствора (i) проводят анализ по методике. Рассчитывают метрологические характеристики по соотношениям ( $c_{st}$  - концентрация в растворе сравнения):

$$X_i (\%) = \frac{c_i}{c_{st}} \cdot 100 \quad (28)$$

$$\bar{X}(\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} X_i \quad (29)$$

$$S_{C,r}(\%) = S_X(\%) = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (30)$$

$$\Delta \bar{X}(\%) = t(95\%, n-1) \cdot \frac{S_X}{n} \quad (31)$$

В соответствии с общей статьей ГФУ «Валидация», для оценки внутрилабораторной точности необходимо оценить влияние на методику внутрилабораторных факторов: разные дни, разные аналитики (субъективный фактор), разное оборудование и т.д. Поэтому необходимо провести анализ той же серии с тем же числом параллельных растворов в другие дни, на другом спектрофотометре, другому аналитику и с использованием другой мерной посуды. Обычно достаточно  $m = 3$  таких анализа в три разных дня, желательно, разнесенных во времени (хорошо бы один зимой, а другой летом).

Величины X для разных дней (j) должны быть статистически неразличимы. Для выяснения этого рассчитывают объединенное стандартное отклонение  $S_o$  на основе стандартных отклонений разных дней  $S_{X,j}$ :

$$S_o(\%) = \sqrt{\sum_{j=1}^{j=m} \frac{S_{X,j}^2}{m}} \quad (32)$$

Для максимального различия между величинами X разных дней (k, j) должно выполняться соотношение:

$$\max |X_k - X_j| \leq \sqrt{2} \cdot t(95\%, f) \cdot S_o. \quad (33)$$

$$f = m \cdot (n - 1).$$

**Проверка робастности**

В общей статье ГФУ «Валидация» указывается, что на стадии разработки методики необходимо проверить и ее робастность, т.е. устойчивость методики к малым изменениям условий проведения эксперимента.

При этих изменениях условий происходит изменение оптической плотности A, которое выступает как систематическая погрешность. Поэтому относительное изменение оптической плотности должно удовлетворять соотношению (7). Возможны и другие обоснованные подходы к регламентации устойчивости оптической плотности.

В случае СФ-анализа важнейшими характеристиками являются:

1) *Устойчивость анализируемого раствора во времени.* Если в АНД не регламентируется время, через которое проводится измерение A, то необходимо проверить устойчивость A в течение, как минимум, 1 ч. Если в АНД время регламентируется, необходимо проверять устойчивость A в пределах, обоснованных в Пояснительной записке. Особенно это важно в случае МПП. В случае МС эти же ограничения действуют для максимального различия во времени между измерениями A испытуемого раствора и раствора сравнения.

2) *Влияние рН.* При СФ-анализе веществ кислотно-основного характера следует работать в средах с фиксированным рН. Для этой цели растворы обычно подкисляют кислотой хлористоводородной до рН = 2-3. Следует проверить влияние на оптическую плотность изменений кислотности (например,  $\pm 10\%$  от номинальной).

3) В случае цветных реакций следует проверить влияние колебаний в количестве реагентов.

**Выводы**

Предложена и обоснована схема проведения валидации количественного спектрофотометрического анализа в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр", 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Technical Guide for the Elaboration of monographs. 3<sup>rd</sup> ed. // *Pharmeuropa*. - 1999. - December.
3. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Content limits in the European Pharmacopoeia // *Pharmeuropa*. 1997. - V.9, № 1. - P.148-156.
4. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Content limits in the European Pharmacopoeia // *Pharmeuropa*. - 1998. - V.10, № 1. - P. 137-146.
5. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Relationship Between Content Limits, System Suitability for Precision and Acceptance/Rejection Criteria for Assays Using Chromatographic Methods // *Pharmeuropa*. - 1999. - V.11, № 4. - P..571-577.
6. Гризодуб А.И., Левин М.Г., Леонтьев Д.А., Георгиевский В.П. Стандартизация хроматографического анализа лекарственных средств. Сообщение 1. Метрологические аспекты применения высокoeffективной жидкостной хроматографии // *Фармаком*. - 1995. - № 7. - С. 8-19.
7. Гризодуб А.И., Левин М.Г., Леонтьев Д.А., Вырова Е.В., Доценко Т.Н., Георгиевский В.П. Аттестация стандартных образцов. Сообщение 1. Аттестация вторичных стандартных образцов для количественного хроматографического анализа лекарственных средств // *Фармаком*. – 1999. - № 2. - С. 46-51.
8. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г., Доценко Т.Н. Аттестация стандартных образцов для спектрофотометрического анализа лекарственных средств // *Фізіологічно активні речовини*. – 2000. - № 2 (30). - С. 38-44.
9. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // *Фізіологічно активні речовини*. – 2001. - № 1 (31). - С. 32-44.
10. Надлежащая производственная практика лекарственных средств/ Под редакцией Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – Киев: Морион, 2001. - 470 с.
11. ГОСТ 29227-91. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания.
12. Гризодуб А.И., Асмолова Н.Н., Георгиевский В.П., Белоброва Н.В. Влияние повторных измерений и расширения набора длин волн на точность многоволновой спектрофотометрии по методу наименьших квадратов // *Журн. аналит. химии*. - 1989. - Т.44, № 10. - С. 1824 - 1834.
13. ДСТУ 2681-94. Метрологія. Терміни та визначення. – Київ: Держстандарт України, 1994. - 67 с.

## Резюме

Гризодуб О.І.

**Валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів відповідно до вимог ДФУ**

Розглянуті питання валідації спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів (ЛЗ) відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ). Основну увагу приділено критеріям прийнятності валідаційних характеристик і прогнозу похибки аналізу у своїй лабораторії та інших лабораторіях, що задовольняють вимогам ДФУ.

## Summary

Grisodub A.I.

**Validation of spectrophotometric procedures of drug assay in compliance with SPU**

*Report on information and methodical seminar «Validation of drug analysis procedures», Kiev, 12<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> March, 2002*

The matters of validation of medicinal agents (MA) assay spectrophotometric procedures in compliance with State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) requirements were examined. The main consideration was given to the acceptance criteria of validation characteristics and the prognosis of analysis error in domestic laboratory and other laboratory satisfying the SPU requirements.

**Гризодуб Александр Иванович.** Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992). Канд. хим. наук (1982). Доктор хим. наук (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации аналитических химиков (1997).

УДК 615.076

Жемерова Е.Г., Кобзарь А.И., Хованская Н.П.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## **К вопросу контроля микробиологической чистоты лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. Сообщение 1. Проверка пригодности методик определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов**

Разработаны схемы проверки пригодности методик испытания на микробиологическую чистоту (определение общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов) при использовании метода прямого посева и метода мембранной фильтрации. В работе изложены методические рекомендации по проведению проверки пригодности методик испытания микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств.

В Государственную Фармакопею Украины первого издания включены 3 общие статьи, касающиеся контроля микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств. Две из них содержат описание методов испытания микробиологической чистоты: это статья 2.6.12 «Испытание микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств (определение общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов)» и статья 2.6.13 «Испытание микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств (испытание на отдельные виды микроорганизмов)». Статья 5.1.4 «Микробиологическая чистота лекарственных средств» устанавливает допустимые нормативы микробиологической чистоты для различных категорий лекарственных средств в зависимости от способа применения и лекарственной формы.

В статьях 2.6.12 и 2.6.13 описаны общие подходы к испытанию микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, но при разработке методики испытания для включения в АНД необходимо учитывать особенности каждого лекарственного средства, связанные с природой препарата, его лекарственной формой и возможным влиянием на жизнеспособность микроорганизмов, которые могут быть выделены при проведении испытания. В ГФУ указано, что при выборе метода испытания следует учитывать природу испытуемого лекарственного средства и необходимо надлежащим образом провести проверку пригодности выбранной методики испытания.

Проверка пригодности методики является важным этапом разработки раздела «Микробиологическая чистота» для АНД. При проверке пригодности методики должны быть учтены все факторы, которые могут повлиять

на результаты определения микробиологической чистоты препарата.

Основными факторами являются:

- пробоподготовка (количество и состав растворителя; наличие эмульгаторов, инактиваторов и т.д.; использование нагревания, встряхивания и других приемов для эмульгирования, суспендирования или растворения; время приготовления испытуемого образца);
- влияние испытуемого препарата на жизнеспособность микроорганизмов (антимикробное действие), связанное с природой лекарственного средства;

- технические приемы, которые используются для проведения испытания (метод испытания, тип мембранных фильтров и/или префильтров, скорость фильтрации и т.д.).

Для того, чтобы иметь возможность получать воспроизводимые результаты в различных лабораториях, важно стандартизовать методический подход к проверке пригодности методики.

Ниже мы предлагаем рекомендации по проведению проверки пригодности методик испытания микробиологической чистоты лекарственных средств. Поскольку каждый из разделов 2.6.12 и 2.6.13 содержит описание проведения проверки пригодности по соответствующему виду исследования, мы придерживались той же формы изложения материала. Данное сообщение посвящено проверке пригодности методики определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов, в дальнейших публикациях будет описано проведение проверки пригодности методики испытания на отдельные виды микроорганизмов.

В соответствии с требованиями ГФУ для проверки пригодности методики определения общего числа жизнеспособных аэробных

микроорганизмов используют следующие штаммы тест-микроорганизмов:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83);

- *Escherichia coli* ATCC 8739 (NCIMB 8545, CIP 53.126) или ATCC 25922 (в соответствии с национальной частью статьи 2.6.12 ГФУ);

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIMB 8054, CIP 52.62) или *Bacillus cereus* ATCC 10702 (NCTC 8035) (в соответствии с национальной частью статьи 2.6.12 ГФУ);

- *Candida albicans* ATCC 10231 (NCPF 3179, IP 48.72) или ATCC 885-653 (в соответствии с национальной частью статьи 2.6.12 ГФУ);

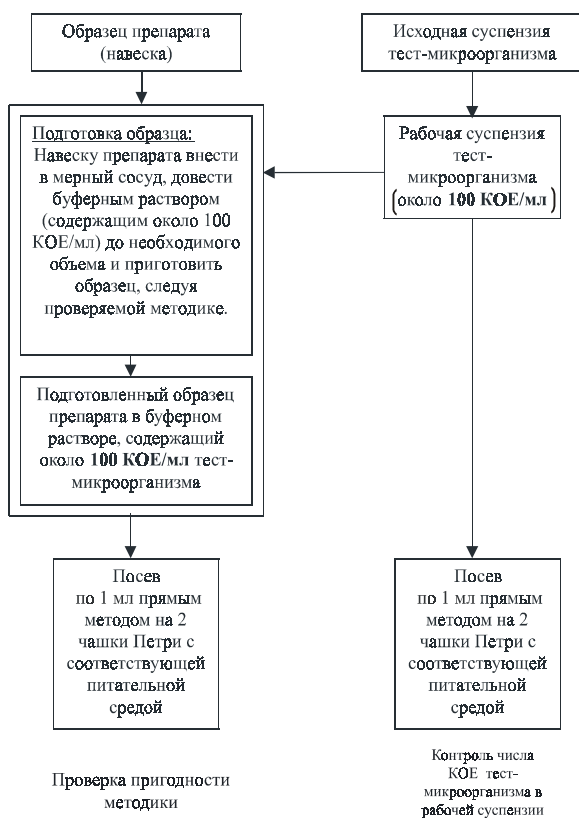
- *Aspergillus niger* ATCC 16404 (IMI 149007, IP 1431.83).

Тест-штаммы *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* следует использовать для проверки пригодности методики определения общего числа бактерий, тест-штаммы *C. albicans* и *A. niger*

- для проверки пригодности методики определения общего числа грибов. По нашему

Рисунок 1

**Схема проверки пригодности методики испытания на микробиологическую чистоту (определение числа жизнеспособных клеток бактерий и грибов в соответствии со статьей 2.6.12 ГФУ) при использовании метода прямого посева**



мнению, разработчик свободен в выборе, какие штаммы тест-микроорганизмов выбирать — в соответствии с европейской или с национальной частью раздела, но все указанные виды микроорганизмов должны быть в обязательном порядке использованы при проверке пригодности методики.

Условия выращивания тест-микроорганизмов подробно описаны в ГФУ, поэтому нет необходимости приводить их здесь. Некоторые затруднения может вызвать выбор питательных сред для выращивания микроорганизмов. Мы рекомендуем использовать такие же среды, как и те, которые будут использоваться при проведении испытания — жидкую среду А (для выращивания бактерий) и среду С без антибиотика (для выращивания грибов) при использовании для испытания питательных сред, описанных в европейской части; жидкую питательную среду № 1 и питательную среду № 2 (без антибиотика), если для испытания используются питательные среды № 1 и № 2.

В ГФУ для определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов рекомендуется использовать метод прямого посева или метод мембранной фильтрации. Поскольку эти методы существенно отличаются, далее мы рассмотрим отдельно процедуру проверки пригодности при использовании каждого из этих методов.

Рекомендуемая схема проверки пригодности методики при использовании метода прямого посева приведена на Рис. 1.

На первом этапе исследований необходимо приготовить исходную суспензию каждого из тест-микроорганизмов. Для облегчения дальнейших расчетов целесообразно готовить исходную суспензию, содержащую около  $10^9$  КОЕ/мл или  $10^8$  КОЕ/мл. Для стандартизации исходной суспензии может быть использован нефелометрический метод, возможно также в серии предварительных опытов подобрать методику приготовления исходной суспензии, а затем использовать эту методику в дальнейшей работе. Рабочие суспензии готовят из исходных методом последовательных десятикратных разведений. Рабочая суспензия должна быть приготовлена в буферном растворе с натрия хлоридом и пептоном и должна содержать около 100 КОЕ/мл.

Далее следует приготовить образец препарата. Для этого навеску испытуемого лекарственного средства вносят в мерный сосуд и

доводят до необходимого объема приготовленной рабочей суспензией тест-микроорганизма. Таким образом, для проверки пригодности одной методики необходимо приготовить пять образцов лекарственного средства — по одному образцу с каждым из тест-микроорганизмов, указанным в ГФУ. При подготовке образца соотношение между массой навески и объемом растворителя, способ подготовки образца (суспендирование, эмульгирование, нагревание, механическое встряхивание), используемые эмульгаторы и инактиваторы (наименование и концентрация) и т.д. должны в точности соответствовать той методике, проверка пригодности которой осу-

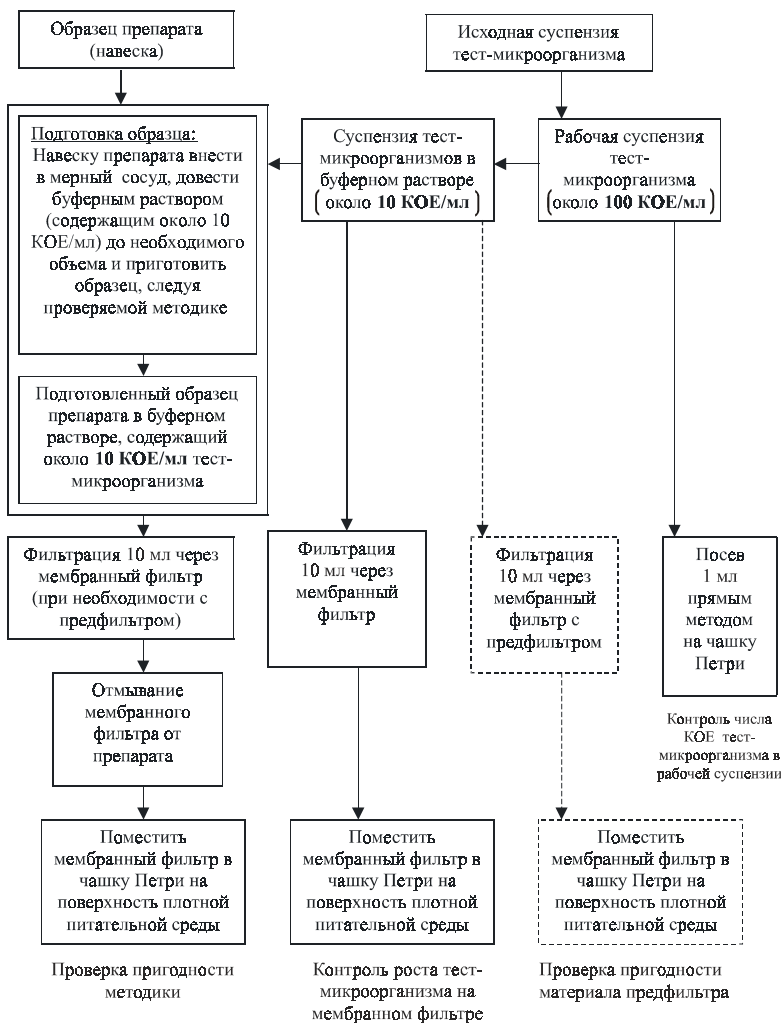
ществляется. При разработке методики, когда необходимо проверять пригодность различных вариантов, может быть использовано масштабирование — навеску препарата можно уменьшить в 10 раз (т.е. вместо 10 г использовать 1 г) и соответственно уменьшить объем рабочей суспензии тест-микроорганизма, который используется для приготовления образца. Каждый подготовленный таким образом образец содержит около 100 КОЕ/мл соответствующего тест-микроорганизма.

Из каждого подготовленного образца высевают прямым методом по 1 мл на чашки Петри с соответствующей питательной средой. Для высева из образцов, содержащих тест-штаммы бактерий, используют среду В (или среду № 1), для высева из образцов, содержащих тест-штаммы грибов — среду С (или среду № 2). Питательная среда должна быть той же, что будет использоваться при испытании на микробиологическую чистоту.

Метод посева, глубинный, поверхностный или двухслойный, также должен соответствовать методике испытания. Таким же методом делают контрольный высев из каждой подготовленной рабочей суспензии для определения в ней числа КОЕ в 1 мл.

Рекомендуемая схема проверки пригодности при использовании метода мембранной фильтрации приведена на Рис. 2. В этом случае схема исследования имеет некоторые отличия, вызванные спецификой метода. Основное отличие состоит в том, что для каждого тест-микроорганизма следует дополнительно приготовить в буферном растворе суспензию, содержащую около 10 КОЕ/мл, и использовать ее при подготовке образца. Необходимость такого этапа вызвана тем, что при использовании метода мембранной фильтрации через каждый мембранный фильтр необходимо пропустить по 10 мл подготовленного образца. В том случае, если подготовленный образец будет содержать 100 КОЕ/мл,

Рисунок 2  
**Схема проверки пригодности методики испытания на микробиологическую чистоту бактерий и грибов в соответствии со статьей 2.6.12 ГФУ при использовании метода мембранной фильтрации**



на каждый мембранный фильтр будет приходиться около 1000 КОЕ, что сделает невозможным подсчет числа колоний на поверхности мембранного фильтра. Напротив, при использовании образца препарата, содержащего 10 КОЕ/мл, число колоний на поверхности каждого мембранного фильтра составит около 100, что является оптимальным значением при количественном учете. Формально, предлагаемая микробная нагрузка меньше, чем требуется ГФУ, но в данном случае при проверке пригодности методики предъявляются более жесткие требования, чем в Фармакопее, кроме того, метод мембранной фильтрации является чувствительным методом, позволяющим определять до 1 КОЕ/мл, и в связи с этим, микробная нагрузка 10 КОЕ/мл более соответствует данному методу, чем нагрузка 100 КОЕ/мл, указанная в ГФУ.

Подготовленный образец препарата (10 мл) пропускают через мембранный фильтр. Тип мембранного фильтра, скорость фильтрации и материал предфильтра (при условии его использования) должны в точности соответствовать проверяемой методике испытания. После окончания фильтрации проводят все необходимые манипуляции, предусмотренные методикой: удаление или замену предфильтра, отмывание мембранного фильтра, а затем помещают мембранный фильтр на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашке Петри.

В данной схеме предусмотрено два контрольных опыта. Один из них в точности соответствует контрольному опыту, который проводится при проверке пригодности метода прямого посева — по 1 мл рабочей суспензии каждого тест-микроорганизма, содержащей 100 КОЕ/мл, высевают на соответствующую плотную питательную среду. Для осуществления посева может быть выбрана любая модификация метода прямого посева. Этот контрольный опыт не является обязательным, однако он помогает выявить технические ошибки, которые могут быть допущены при проведении фильтрации. Обязательный контрольный опыт состоит в том, что по 10 мл взвеси каждого из тест-микроорганизмов, содержащей 10 КОЕ/мл, пропускают через мембранный фильтр (без предфильтра), а затем помещают мембранный фильтр на поверхность соответствующей плотной питательной среды.

Пунктирной линией на схеме показаны операции, которые необходимо проводить для проверки пригодности материала предфильтра. Следует отметить, что при осуществлении всех описанных выше операций по проверке пригодности нет необходимости в проведении данного этапа.

Операции, описанные ниже, проводят как при проверке пригодности метода прямого посева, так и при проверке пригодности метода мембранной фильтрации.

Все посеы инкубируют в термостате. Посевы на питательной среде, предназначенной преимущественно для выявления бактерий, инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С. Посевы на питательной среде, предназначенной преимущественно для выявления грибов, инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С.

Продолжительность инкубации в Фармакопее не указана, однако, очевидно, что она должна быть такой, чтобы обеспечить рост хорошей интенсивности в контроле, таким образом, максимальная продолжительность инкубации не должна превышать интервал времени, установленный для испытания ростовых свойств питательных сред. Продолжительность инкубации при проверке ростовых свойств питательных сред приведена в национальной части и составляет 48 ч для бактерий и 72 ч для грибов. Учет результатов может быть проведен ранее, как правило, достаточно 24 ч инкубации для бактерий и 48 ч для грибов.

По окончании периода инкубации подсчитывают число колоний каждого тест-микроорганизма, выросших в присутствии испытуемого препарата и на контрольных чашках (для метода мембранной фильтрации учитывают результаты обязательного контрольного опыта), подсчитывают средние арифметические значения для каждой двух параллельных чашек.

Для каждого тест-микроорганизма сравнивают результаты подсчета числа тест-микроорганизмов, полученные в присутствии испытуемого препарата и на контрольных посевах. Если полученные результаты отличаются не более, чем в пять раз, то считают, что пригодность методики испытания подтверждена. Такой подход к интерпретации результатов полностью соответствует требованиям ГФУ и должен использоваться при проведении официальной апробации методики.

Если полученные результаты отличаются более, чем в пять раз, то необходимо изменить методику испытания таким образом, чтобы добиться более полной нейтрализации антимикробного действия препарата, а затем провести проверку пригодности измененной методики. Следует отметить, что разработчик АНД может руководствоваться более жесткими критериями оценки пригодности. По нашему мнению, на этапе разработки изменения в методику целесообразно вносить в том случае, если результаты, полученные в контроле и опыте, отличаются более, чем в два раза.

### Выводы

Разработаны схемы проверки пригодности методик испытания на микробиологическую чистоту (определение общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов) при использовании метода прямого посева и метода мембранной фильтрации.

Предлагаем использовать данные схемы при разработке новых методик испытания микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств и проведении апробации методик при проведении предрегистрационного контроля.

Считаем, что только стандартизация методического подхода к проверке пригодности методик контроля микробиологической чистоты лекарственных средств даст возможность получать воспроизводимые результаты в различных лабораториях и давать объективные заключения о пригодности методик при их апробации.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України/Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

2. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - 2002. - P.133-136.

### Резюме

Жемерова К.Г., Кобзар Г.І., Хованська Н.П.

**До питання контролю мікробіологічної чистоти лікарських засобів відповідно до вимог ДФУ. Повідомлення 1. Перевірка придатності методик визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів**

Розроблені схеми перевірки придатності методик випробувань на мікробіологічну чистоту (визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів) при використанні методу прямого висівання і методу мембранної фільтрації. У роботі викладені методичні рекомендації по проведенню перевірки придатності методик випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів.

### Summary

Jemerova E.G., Kobzar A.I., Khovanskaya N.P.

**To the matter of drug microbiological purity control in accordance with SPU requirements. Report 1. Total count of viable aerobic microorganism determination procedures suitability control**

The schemes of microbiological purity test procedure suitability control (determination of total count of viable aerobic microorganisms) when using the method of direct inoculation and membrane filtration method have been developed. In this work the methodical recommendations on microbiological purity of non-sterile drug test procedure suitability control are stated.

**Жемерова Екатерина Георгиевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1970). И.о. зав. лабораторией микробиологических исследований ГНЦЛС (2002). Науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр".

**Кобзарь Анна Ивановна.** Окончила биологический факультет Харьковского государственного университета (1970). Канд. биол. наук (1994).

**Хованская Наталья Петровна.** Окончила Харьковский государственный университет. Работает в ГНЦЛС (с 1970). Зав. лабораторией фармакопейного анализа ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр". Канд. фарм. наук (1992).

## До видання Доповнення до Державної Фармакопеї України

Вашему вниманию представлены проекты монографий Дополнения к ГФУ первого издания «Этанол безводный», «Этанол (96 %)», которые являются адаптированными переводами соответствующих статей Европейской Фармакопеи 4-го издания, 2002 г.

Исходные варианты проектов были представлены в отдел ГФУ доктором хим. наук., проф. А.И. Гризодубом (зам. директора ГП «НЭФЦ» по научной работе).

Ответственный исполнитель по отделу ГФУ - канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Е.К. Товмасын.

В обсуждении проектов приняли участие Н.П. Хованская (канд. хим. наук, зав. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ), А.А. Зинченко (ст. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа), А.Г. Пиотровская (ученый секретарь ГП НЭФЦ), М.Г. Левин (докт. хим. наук, зав. отд. ГФУ), И.И. Юдина (главный специалист ГП НЭФЦ).

Ваши замечания и предложения к проектам статей Вы можете направлять в адрес ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (отдел ГФУ) или журнала «Фармаком». Приглашаем всех заинтересованных лиц к открытому обсуждению на Форуме сайта журнала «Фармаком» [Farmacomua.narod.ru](http://Farmacomua.narod.ru).

### ЭТАНОЛ (96 %)

Ethanolum (96 per centum)

#### ETHANOL (96 PER CENT)

Етанол (96 %) містить при температурі 20 °С не менше 95.1 % об/об (92.6 % м/м) і не більше 96.9 % об/об (95.2 % м/м)  $C_2H_6O$  (М.м. 46.07), розрахованих із відносних густин, використовуючи алкоголеметричні таблиці (5.5), а також воду.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Безбарвна, прозора, летка, легкозаймиста рідина. Гігроскопічна.

**Розчинність.** Змішується з водою *P* і метиленхлоридом *P*.

(Горить голубим, бездимним полум'ям. Кипить при температурі близько 78 °С).

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: **A, B.**

Друга ідентифікація: **A, C, D.**

**A.** Субстанція має відповідати вимогам щодо відносної густини, зазначеним у розділі "Випробування на чистоту".

**B.** Інфрачервоний спектр (2.2.24) субстанції має відповідати еталонному спектру ДФУ етанолу (96 %).

**C.** 0.1 мл субстанції змішують у пробірці з 1 мл 10 г/л розчину калію перманганату *P* і 0.2 мл кислоти сірчаної розведеної *P*. Пробірку негайно накривають фільтрувальним папером, змоченим свіжоприготованим розчином, що містить 0.1 г натрію нітропрусиду *P* і 0.5 г піперазину гідрату *P* у 5 мл води *P* через декілька хвилин на папері утворюється інтенсивне блакитне забарвлення, яке блідне через 10-15 хв.

**D.** До 0.5 мл субстанції додають 5 мл води *P*, 2 мл розчину натрію гідроксиду розведеного *P*, потім повільно додають 2 мл 0.05 *M* розчину йоду; протягом 30 хв утворюється жовтий осад.

#### ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Прозорість (2.2.1).** Субстанція має бути прозорою в порівнянні з водою *P*. 1.0 мл субстанції доводять водою *P* до об'єму 20 мл. Одержаний розчин через 5 хв має бути прозорим у порівнянні з водою *P*.

**Кольоровість (2.2.2, метод II).** Субстанція має бути безбарвною у порівнянні з водою *P*.

**Кислотність або лужність.** До 20 мл субстанції додають 20 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, *P* і 0.1 мл розчину фенолфталеїну *P*; розчин безбарвний. До одержаного розчину додають 1.0 мл 0.01 *M* розчину натрію гідроксиду; з'являється рожеве забарвлення (не більше 0.003 % (30 ppm), у перерахунку на кислоту оцтову).



**Відносна густина (2.2.5).** Від 0.805 до 0.812.

**Оптична густина.** Оптична густина (2.2.25) субстанції, виміряна в області від 235 нм до 340 нм, у кюветі з товщиною шару 5 см, має бути не більше 0.40 за довжини хвилі 240 нм, 0.30 в області довжин хвиль від 250 нм до 260 нм і 0.1 в області довжин хвиль від 270 нм до 310 нм. Як компенсаційний розчин використовують воду Р. УФ-спектр поглинання має бути плавним.

**Леткі домішки.** Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

**Випробовуваний розчин (а).** Випробовувана субстанція.

**Випробовуваний розчин (b).** 150 мкл 4-метилпентан-2-олу Р додають до 500.0 мл випробовуваної субстанції.

**Розчин порівняння (а).** 100 мкл метанолу безводного Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 50 мкл метанолу безводного Р і 50 мкл ацетальдегіду Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (с).** 150 мкл ацеталю Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (d).** 100 мкл бензолу Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 100.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна розміром 30 м x 0.32 мм, покрита шаром полі[[ціанопропіл](феніл)][[диметил]силоксану Р завтовшки 1.8 мм;
- газ-носієм гелій для хроматографії Р;
- лінійна швидкість газу-носія 35 см/с;
- поділ потоку 1:20;
- використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 - 12	40
	12 - 32	40 → 240
	32 - 42	240
Блок вводу проб		200
Детектор		280

Хроматографують 1 мкл розчину порівняння (b). Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення першого (ацетальдегід) і другого (метанол) піків становить не менше 1.5.

Поперемінно хроматографують по 1 мкл кожного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину (а) площа піка метанолу не має перевищувати половини площі відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) 0.02 % (200 ppm об/об).

Сумарний вміст ацетальдегіду і ацеталю (X) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину (а), розчину порівняння (b) і розчину порівняння (с) за формулою:

$$X = \frac{10 \times A_E}{A_T - A_E} + \frac{30 \times C_E}{C_T - C_E}$$

де:

$A_E$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$A_T$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b),

$C_E$  - площа піка ацеталю на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$C_T$  - площа піка ацеталю на хроматограмі розчину порівняння (с).

Сумарний вміст ацетальдегіду і ацеталю в субстанції, у перерахунку на ацетальдегід, не має перевищувати 0.001 % (10 ppm) об/об.

Вміст бензолу (X) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмі випробовуваного розчину (а) і розчину порівняння (d), за формулою:

$$X = \frac{2B_E}{B_T - B_E}$$

де:

$B_E$  - площа піка бензолу на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$B_T$  - площа піка бензолу на хроматограмі розчину порівняння (d).

Дана хроматограма не є обов'язковою частиною монографії і має тільки інформаційний характер

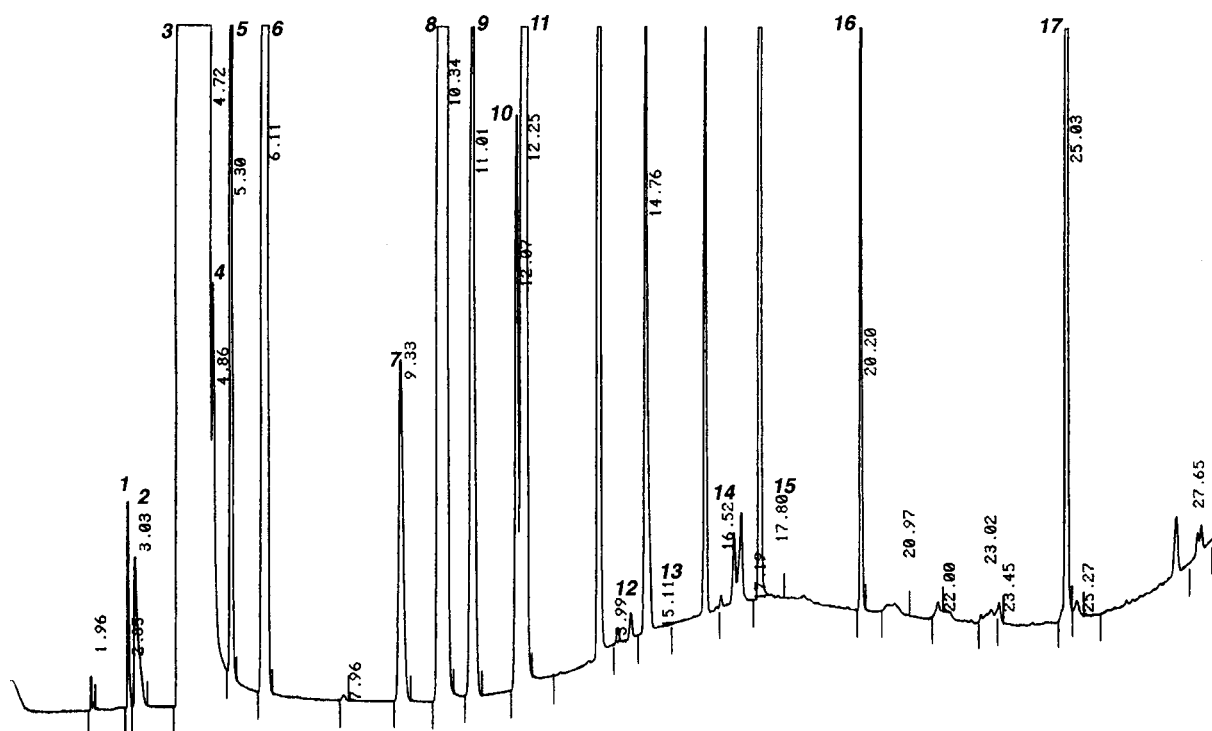


Рисунок 1317.-1. — Летки домішки: типова хроматограма суміші етанолу і шістнадцяти домішок

- |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| 1. ацетальдегід         | 10. бензол             |
| 2. метанол              | 11. 2-метил-1-пропанол |
| 3. етанол               | 12. бутанол            |
| 4. ацетон               | 13. ацеталь            |
| 5. 2-пропанол           | 14. метилізобутилкетон |
| 6. <i>tert</i> -бутанол | 15. пентанол           |
| 7. метилетилкетон       | 16. фурфурол           |
| 8. 2-бутанол            | 17. октанол            |
| 9. циклогексан          |                        |

Якщо необхідно, ідентифікація бензолу може бути підтверджена з використанням іншої придатної хроматографічної системи (стаціонарної фази іншої полярності).

Вміст бензолу в субстанції не має перевищувати 0.0002 % (2 ppm) об/об.

На хроматограмі випробовуваного розчину (b) сума площ усіх піків, крім основного і піків метанолу, ацетальдегіду, ацеталю та бензолу, не має перевищувати площу піка 4-метилпентан-2-олу 0.03 % (300 ppm). Не враховують піки, площа яких становить менше 0.03 площі 4-метилпентан-2-олу на хроматограмі випробовуваного розчину (b) 0.0009 % (9 ppm).

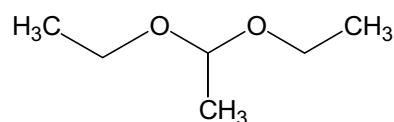
**Сухий залишок.** 100 мл субстанції випарюють насухо на водяній бані і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год.

Сухий залишок не має перевищувати 2.5 мг (25 ppm м/об).

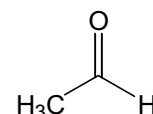
#### ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

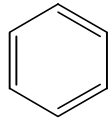
#### ДОМІШКИ:



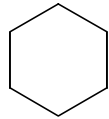
A. 1,1-діетоксіетан (ацеталь),



B. ацетальдегід,  
C. ацетон,

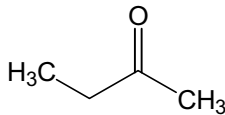


D. бензол,

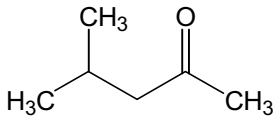


E. циклогексан,

F.  $\text{CH}_3\text{-OH}$  : метанол,



G. бутан-2-он (метилетилкетон),

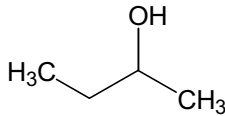


H. 4-метилпентан-2-он (метилізобутилкетон)

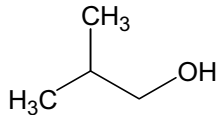
I.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$  : пропанол,

J. пропан-2-ол (ізопропіловий спирт),

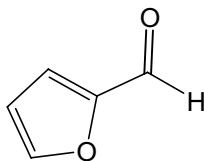
K.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-OH}$  : бутанол,



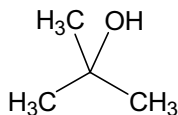
L. бутан-2-ол,



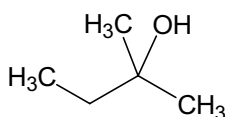
M. 2-метилпропанол (ізобутанол),



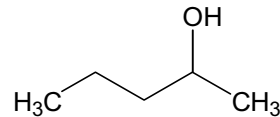
N. фуран-2-карбальдегід (фуфурол),



O. 2-метилпропан-2-ол (1,1-диметилловий спирт),



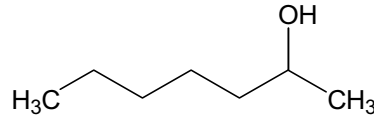
P. 2-метилбутан-2-ол,



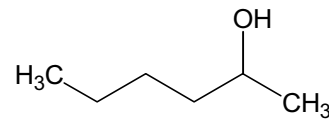
Q. пентан-2-ол,

R.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-OH}$  : пентанол,

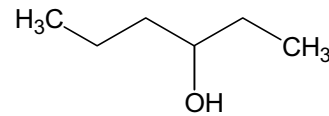
S.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-OH}$  : гексанол,



T. гептан-2-ол,



U. гексан-2-ол,



V. гексан-3-ол.

**N**

**Леткі домішки.** У тому разі, коли субстанція відповідає вимогам, що висуваються до етанолу для харчових цілей, випробування летких домішок може проводитися методом газової хроматографії (2.2.28) таким чином.

*Випробовуваний розчин (a).* Випробовувана субстанція.

*Випробовуваний розчин (b).* 150 мкл 4-метилпентан-2-олу P додають до 500.0 мл випробовуваної субстанції.

*Розчин порівняння (a).* 100 мкл метанолу безводного P доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 50 мкл метанолу безводного P, 50 мкл ацетальдегіду P і 50 мкл пропіонового альдегіду P доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (d).* 100 мкл бензолу P доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 100.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна розміром 50 м x 0.32 мм, покрита шаром макрогелу

20 000 2-нітротерефталатом Р завтовшки 1.8 мм;

- газ-носіє гелій для хроматографії Р;

- швидкість газу-носія 1.0 мл/хв;

- поділ потоку 1:60;

Дана хроматограма не є обов'язковою частиною монографії і має тільки інформаційний характер

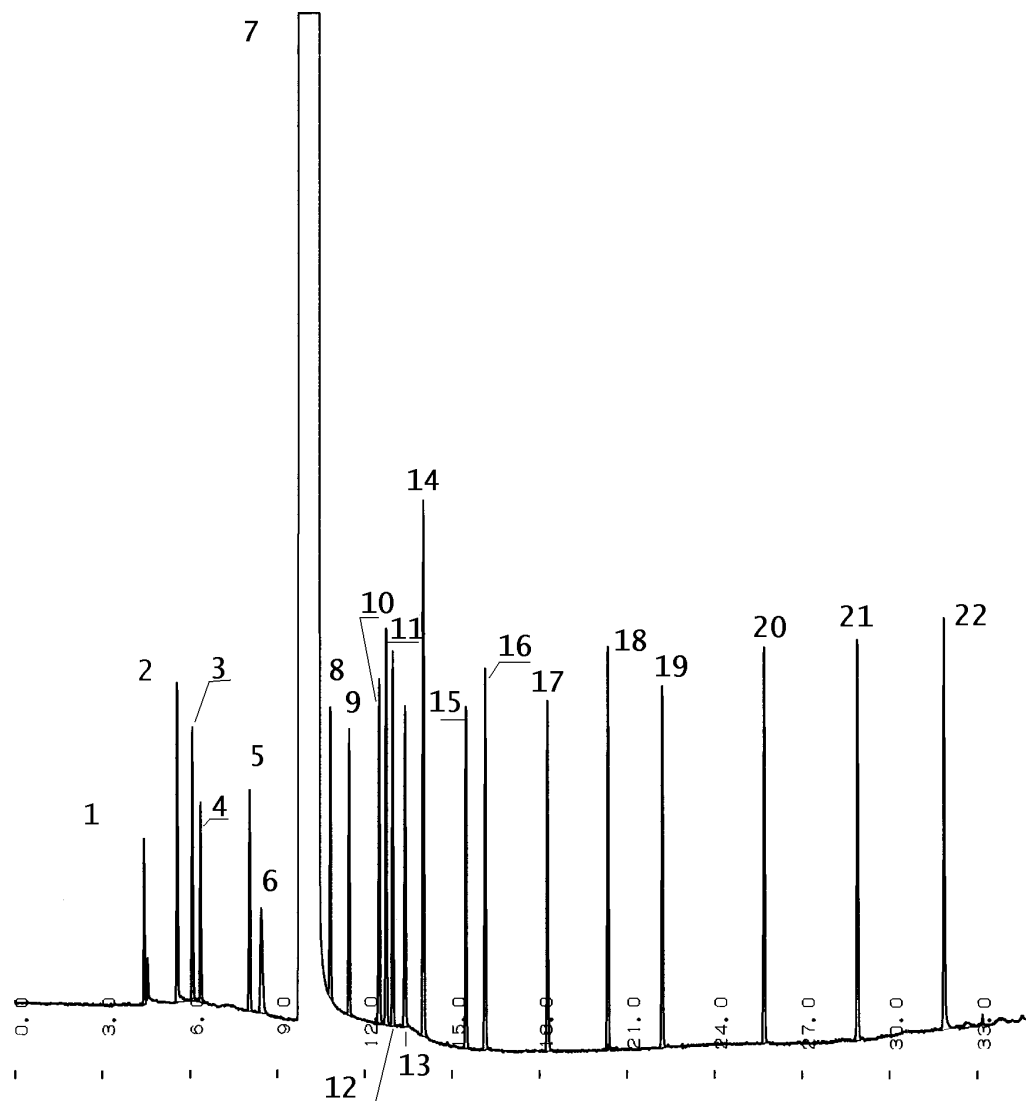


Рисунок 1317.-2. — Летки домішки: типова хроматограма суміші етанолу і двадцяти однієї домішки

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. ацетальдегід                 | 12. 4-метилпентан-2-он (ізобутилацетат) |
| 2. пропіоновий альдегід         | 13. бутан-2-ол                          |
| 3. ацетон                       | 14. пропанол                            |
| 4. метилацетат                  | 15. бутилацетат                         |
| 5. етилацетат                   | 16. ізобутанол (2-метилпропанол)        |
| 6. метанол                      | 17. бутанол                             |
| 7. етанол                       | 18. 4-метил-пентан-2-ол                 |
| 8. етилпропіонат                | 19. пентанол                            |
| 9. пропілацетат                 | 20. гексанол                            |
| 10. бензол                      | 21. гептанол                            |
| 11. бутан-2-он (метилетилкетон) | 22. октанол                             |

- використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 - 7	40
	7 - 23	40 → 152
	23 - 33	152
Блок вводу проб		200
Детектор		200

Хроматографують 1 мкл розчину порівняння (b). Чутливість системи регулюють таким чином, щоб висоти двох піків, що виходять перед основним піком, становили не менше 50 % шкали реєструючого пристрою. Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення першого (ацетальдегід) і другого (пропіоновий альдегід) піків становить не менше 2.0. Якщо необхідно, знижують початкову температуру колонки.

Хроматографують по 1 мкл кожного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа піка метанолу не має перевищувати половини площі відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) 0.02 % (200 ppm об/об).

Сумарний вміст ацетальдегіду і пропіонового альдегіду (X) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину (a) і розчину порівняння (b) за формулою:

$$X = \frac{10 \times A_E}{A_T - A_E} + \frac{10 \times C_E}{C_T - C_E}$$

де:

$A_E$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (a),

$A_T$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b),

$C_E$  - площа піка пропіонового альдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (a),

$C_T$  - площа піка пропіонового альдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b).

Сумарний вміст ацетальдегіду і пропіонового альдегіду в субстанції, у перерахунку на ацетальдегід, не має перевищувати 0.001 % (10 ppm) об/об.

Вміст бензолу (X) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмі випробовуваного розчину (a) і розчину порівняння (d) за формулою:

$$X = \frac{2B_E}{B_T - B_E}$$

де:

$B_E$  - площа піка бензолу на хроматограмі випробовуваного розчину (a),

$B_T$  - площа піка бензолу на хроматограмі розчину порівняння (d).

Якщо необхідно, ідентифікація бензолу може бути підтверджена з використанням іншої придатної хроматографічної системи (стаціонарної фази іншої полярності).

Вміст бензолу в субстанції не має перевищувати 0.0002 % (2 ppm) об/об.

На хроматограмі випробовуваного розчину (b) сума площ усіх піків, крім основного і піків метанолу, ацетальдегіду та бензолу, не має перевищувати площі піку 4-метилпентан-2-олу 0.03% (300 ppm). Не враховують піки, площа яких становить менше 0.03 площі 4-метилпентан-2-олу на хроматограмі випробовуваного розчину (b) 0.009 % (9 ppm).

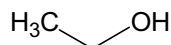
**Залізо (2.4.9).** Не більше 0.0001 % (1 ppm). Сухий залишок, одержаний у випробування "Сухий залишок", розчиняють у 1 мл 1 M розчину кислоти хлористоводневої, кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину водою P до позначки і перемішують. 10 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на залізо.

**Важкі метали (2.4.8, метод A).** Не більше 0.0002 % (2 ppm). 12.0 мл розчину, приготованого для випробування "Залізо", мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 10 мл еталонного розчину свинцю (2 ppm Pb) P.

## ЕТАНОЛ БЕЗВОДНИЙ

Ethanolum anhydricum

## ETHANOL, ANHYDROUS

C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OM<sub>r</sub> 46.07

Етанол безводний містить при температурі 20 °С не менше 99.5 % об/об C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (99.2 % м/м), розрахованих із відносних густин, використовуючи алкоголеметричні таблиці (5.5).

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Безбарвна, прозора, летка, легкозаймиста рідина. Гігроскопічна.

**Розчинність.** Змішується з водою Р і метиленхлоридом Р.

(Горить голубим, бездимним полум'ям. Кипить при температурі близько 78 °С).

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В.

Друга ідентифікація: А, С, D.

**А.** Субстанція має відповідати вимогам щодо відносної густини, зазначеним у розділі "Випробування на чистоту".

**В.** Інфрачервоний спектр (2.2.24) субстанції має відповідати еталонному спектру ДФУ етанолу безводного.

**С.** 0.1 мл субстанції змішують у пробірці з 1 мл розчину 10 г/л калію перманганату Р і 0.2 мл кислоти сірчаної розведеної Р. Пробірку негайно накривають фільтрувальним папером, змоченим свіжоприготованим розчином, що містить 0.1 г натрію нітропрусику Р і 0.5 г піперазину гідрату Р у 5 мл води Р; через декілька хвилин на папері утворюється інтенсивне блакитне забарвлення, яке блідне через 10-15 хв.

**D.** До 0.5 мл субстанції додають 5 мл води Р, 2 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р, потім повільно додають 2 мл 0.05 М розчину йоду; протягом 30 хв утворюється жовтий осад.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Прозорість (2.2.1).** Субстанція має бути прозорою в порівнянні з водою Р. 1.0 мл субстанції доводять водою Р до об'єму 20 мл. Одержаний розчин через 5 хв має бути прозорим у порівнянні з водою Р.

**Кольоровість (2.2.2, метод II).** Субстанція має бути безбарвною в порівнянні з водою Р.

**Кислотність або лужність.** До 20 мл субстанції додають 20 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, Р і 0.1 мл розчину фенолфталеїну Р; розчин безбарвний. До одержаного розчину додають 1.0 мл 0.01 М розчину натрію гідроксиду; з'являється рожеве забарвлення (не більше 0.003 % (30 ppm), у перерахунку на кислоту оцтову).

**Відносна густина (2.2.5).** Від 0.790 до 0.793.

**Оптична густина.** Оптична густина (2.2.25) субстанції, виміряна в області від 235 нм до 340 нм, у кюветі з товщиною шару 5 см, має бути не більше 0.40 за довжини хвилі 240 нм, 0.30 в області довжин хвиль від 250 нм до 260 нм і 0.1 в області довжин хвиль від 270 нм до 310 нм. Як компенсаційний розчин використовують воду Р. УФ-спектр поглинання має бути плавним.

**Леткі домішки.** Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

**Випробовуваний розчин (а).** Випробовувана субстанція.

**Випробовуваний розчин (b).** 150 мкл 4-метилпентан-2-олу Р додають до 500.0 мл випробовуваної субстанції.

**Розчин порівняння (а).** 100 мкл метанолу безводного Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 50 мкл метанолу безводного Р і 50 мкл ацетальдегіду Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (с).** 150 мкл ацеталу Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (d). 100 мкл бензолу Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 100.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна розміром 30 м x 0.32 мм, покрита шаром полі[(ціанопропіл) (феніл)][диметил]силоксану Р завтовшки 1.8 мм;
- газ-носіє гелій для хроматографії Р;
- лінійна швидкість газу-носія 35 см/с;
- поділ потоку 1:20;
- використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 - 12	40
	12 - 32	40 → 240
	32 - 42	240
Блок вводу проб		200
Детектор		280

Хроматографують 1 мкл розчину порівняння (b). Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення першого (ацетальдегід) і другого (метанол) піків становить не менше 1.5.

Попеременно хроматографують по 1 мкл кожного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа піка метанолу не має перевищувати половини площі відповід-

Дана хроматограма не є обов'язковою частиною монографії і має тільки інформаційний характер

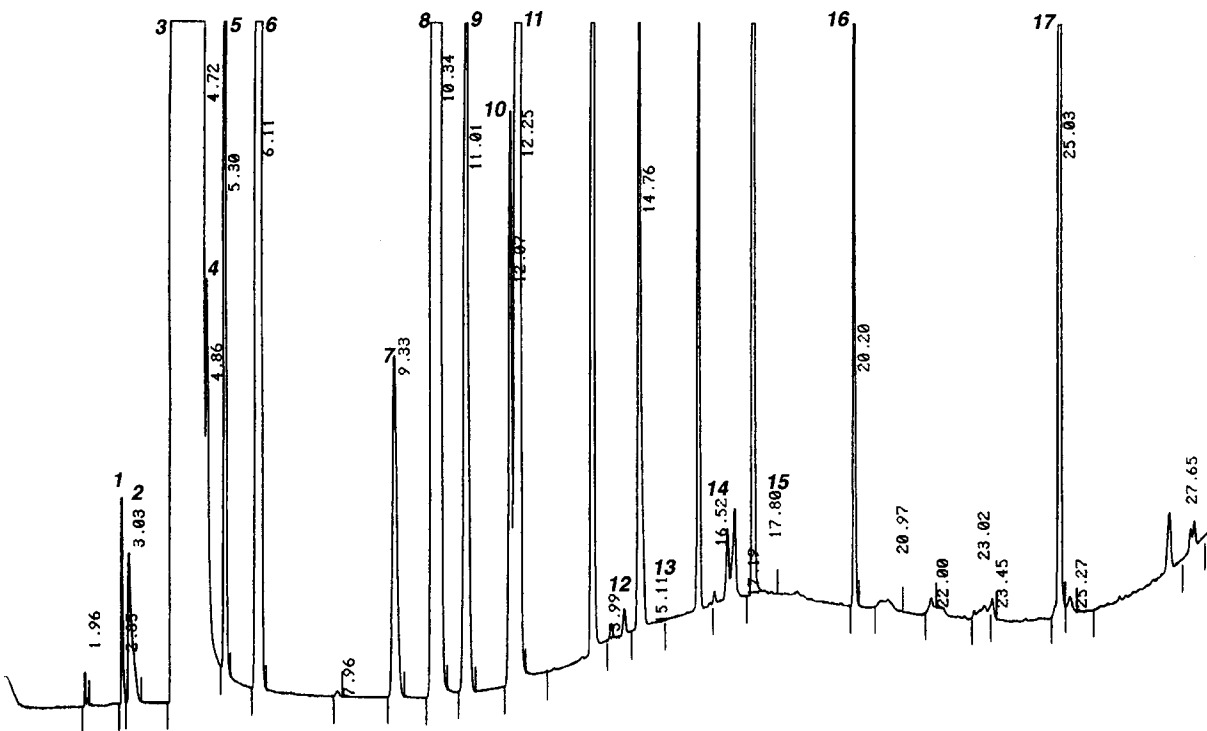


Рисунок 1318.-1. — Леткі домішки: типова хроматограма суміші етанолу і шістнадцяти домішок

- |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| 1. ацетальдегід         | 10. бензол             |
| 2. метанол              | 11. 2-метил-1-пропанол |
| 3. етанол               | 12. бутанол            |
| 4. ацетон               | 13. ацеталь            |
| 5. 2-пропанол           | 14. метилізобутилкетон |
| 6. <i>tert</i> -бутанол | 15. пентанол           |
| 7. метилетилкетон       | 16. фурфурол           |
| 8. 2-бутанол            | 17. октанол            |
| 9. циклогексан          |                        |

ного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) 0.02 % (200 ppm) об/об.

Сумарний вміст ацетальдегіду і ацеталу ( $X$ ) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину (а), розчинів порівняння (b) і розчину порівняння (с) за формулою:

$$X = \frac{10 \times A_E}{A_T - A_E} + \frac{30 \times C_E}{C_T - C_E},$$

де:

$A_E$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$A_T$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b),

$C_E$  - площа піка ацеталу на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$C_T$  - площа піка ацеталу на хроматограмі розчину порівняння (с).

Сумарний вміст ацетальдегіду і ацеталу в субстанції, у перерахунку на ацетальдегід, не має перевищувати 0.001 % (10 ppm) об/об.

Вміст бензолу ( $X$ ) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмі випробовуваного розчину (а) і розчину порівняння (d) за формулою:

$$X = \frac{2B_E}{B_T - B_E},$$

де:

$B_E$  - площа піка бензолу на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

$B_T$  - площа піка бензолу на хроматограмі розчину порівняння (d).

Якщо необхідно, ідентифікація бензолу може бути підтверджена з використанням іншої придатної хроматографічної системи (стаціонарної фази іншої полярності).

Вміст бензолу в субстанції не має перевищувати 0.0002 % (2 ppm) об/об.

На хроматограмі випробовуваного розчину (b) сума площ усіх піків, крім основного і піків метанолу, ацетальдегіду, ацеталу і бензолу, не має перевищувати площу піка 4-метилпентан-2-олу 0.03 % (300 ppm). Не враховують піки, площа яких становить менше 0.03 площі 4-метилпентан-2-олу на хроматограмі випробовуваного розчину (b) 0.0009% (9 ppm).

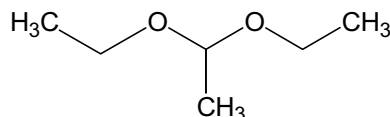
**Сухий залишок.** 100 мл субстанції випарюють насухо на водяній бані і сушать при температурі від 100 °C до 105 °C протягом 1 год.

Сухий залишок не має перевищувати 2.5 мг (25 ppm м/об).

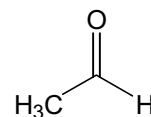
#### ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

#### ДОМІШКИ:

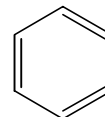


A. 1,1-діетоксіетан (ацеталь),

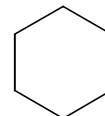


B. ацетальдегід,

C. ацетон,

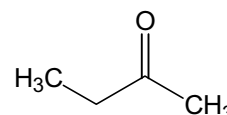


D. бензол,

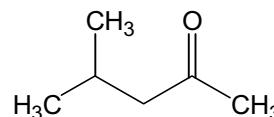


E. циклогексан,

F.  $\text{CH}_3\text{-OH}$  : метанол,



G. бутан-2-он (метилетилкетон),

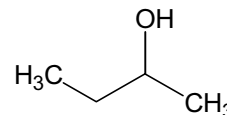


H. 4-метилпентан-2-он (метил ізобутилкетон),

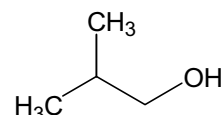
I.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$  : пропанол,

J. пропан-2-ол (ізопропіловий спирт),

K.  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-OH}$  : бутанол,

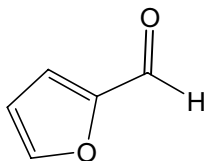


L. бутан-2-ол,

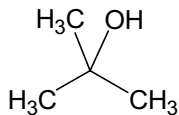




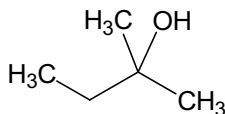
**M.** 2-метилпропанол (ізобутанол),



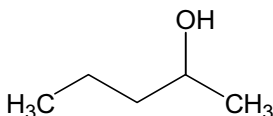
**N.** фуран-2-карбальдегід (фурфурол),



**O.** 2-метилпропан-2-ол (1,1-диметиловий спирт),



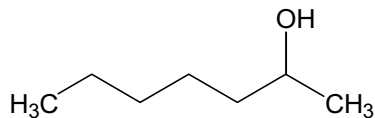
**P.** 2-метилбутан-2-ол,



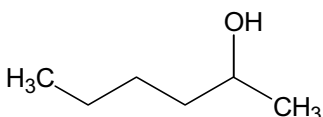
**Q.** пентан-2-ол,

**R.**  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$  : пентанол,

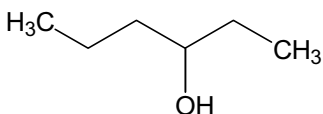
**S.**  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{OH}$  : гексанол,



**T.** гептан-2-ол,



**U.** гексан-2-ол,



**V.** гексан-3-ол.

*Розчин порівняння (a).* 100 мкл метанолу безводного Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 50 мкл метанолу безводного Р, 50 мкл ацетальдегіду Р і 50 мкл пропіонового альдегіду Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (d).* 100 мкл бензолу Р доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 100.0 мл. 100 мкл одержаного розчину доводять випробовуваною субстанцією до об'єму 50.0 мл.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна розміром 50 м x 0.32 мм, покрита шаром макроглоу 20 000 2-нітротерефталатом Р завтовшки 1.8 мм;
- газ-носії гелій для хроматографії Р;
- швидкість газу-носія 1.0 мл/хв;
- поділ потоку 1:60;
- використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 – 7	40
	7 – 23	40 → 152
	23 – 33	152
Блок вводу проб		200
Детектор		200

Хроматографують 1 мкл розчину порівняння (b). Чутливість системи регулюють таким чином, щоб висоти двох піків, що виходять перед основним піком, становили не менше 50 % шкали реєструючого пристрою. Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення першого (ацетальдегід) і другого (пропіонової альдегід) піків становить не менше 2.0. Якщо необхідно, знижують початкову температуру колонки.

Хроматографують по 1 мкл кожного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа піка метанолу не має перевищувати половини площі відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) 0.02% (200 ppm) об/об.

**N**

**Леткі домішки.** Випробування летких домішок може проводитися методом газової хроматографії (2.2.28) таким чином.

*Випробовуваний розчин (a).* Випробовувана субстанція.

*Випробовуваний розчин (b).* 150 мкл 4-метилпентан-2-олу Р додають до 500.0 мл випробовуваної субстанції.

С умарний вміст ацетальдегіду і пропіонового альдегіду ( $X$ ) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину (а) і розчину порівняння (b) за формулою:

$$X = \frac{10 \times A_E}{A_T - A_E} + \frac{10 \times C_E}{C_T - C_E},$$

де:

$A_E$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (а),

Дана хроматограма не є обов'язковою частиною монографії і має тільки інформаційний характер

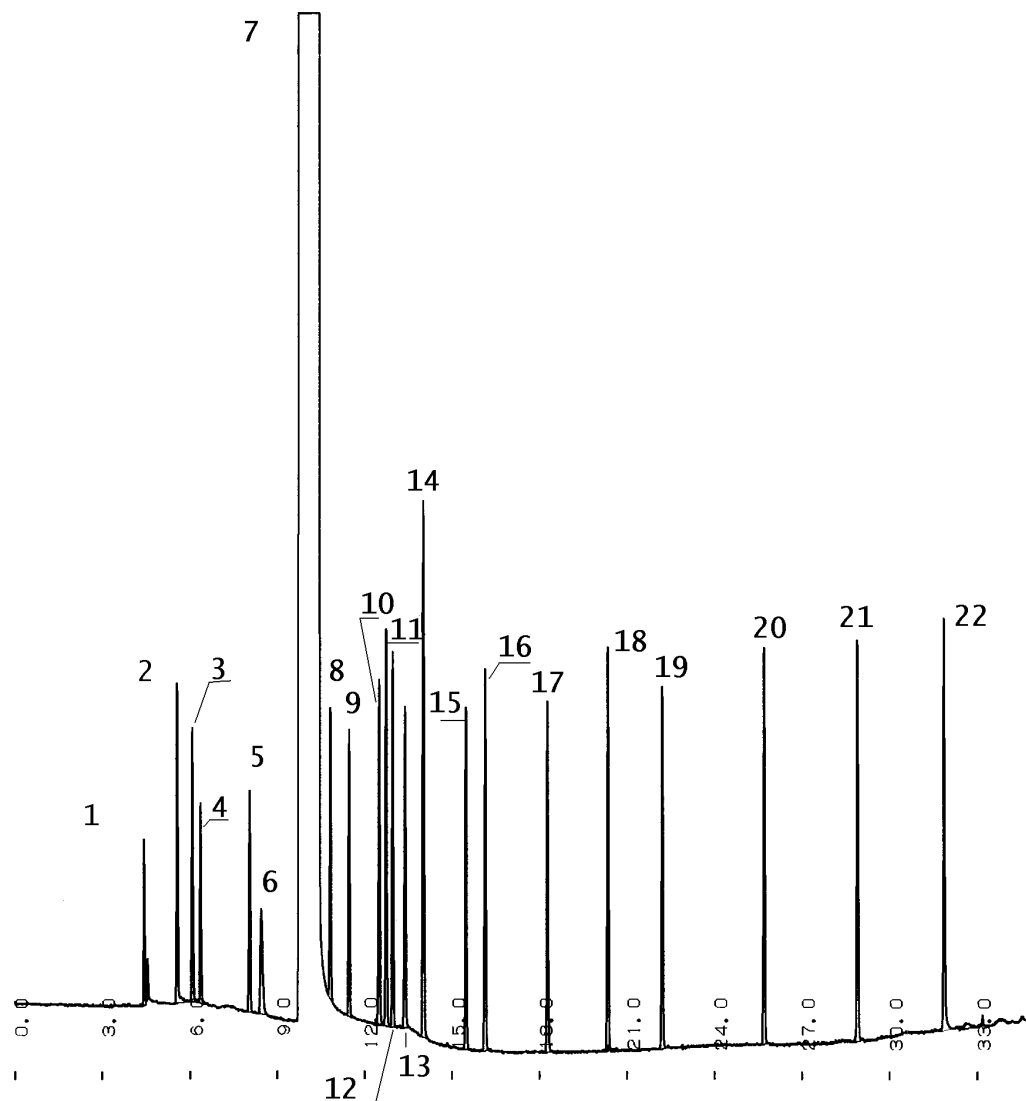


Рисунок 1318.-2. — Летки домішки: типова хроматограма суміші етанолу і двадцяти однієї домішки

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. ацетальдегід                 | 12. 4-метилпентан-2-он (ізобутилацетат) |
| 2. пропіоновий альдегід         | 13. бутан-2-ол                          |
| 3. ацетон                       | 14. пропанол                            |
| 4. метилацетат                  | 15. бутилацетат                         |
| 5. етилацетат                   | 16. ізобутанол (2-метилпропанол)        |
| 6. метанол                      | 17. бутанол                             |
| 7. етанол                       | 18. 4-метилпентан-2-ол                  |
| 8. етилпропіонат                | 19. пентанол                            |
| 9. пропілацетат                 | 20. гексанол                            |
| 10. бензол                      | 21. гептанол                            |
| 11. бутан-2-он (метилетилкетон) | 22. октанол                             |

$A_T$  - площа піка ацетальдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b),

$C_E$  - площа піка пропіонового альдегіду на хроматограмі випробовуваного розчину (a),

$C_T$  - площа піка пропіонового альдегіду на хроматограмі розчину порівняння (b).

Сумарний вміст ацетальдегіду і пропіонового альдегіду в субстанції, у перерахунку на ацетальдегід, не має перевищувати 0.01 % (10 ppm) об/об.

Вміст бензолу ( $X$ ) в субстанції, у ppm, розраховують із площ відповідних піків на хроматограмі випробовуваного розчину (a) і розчину порівняння (d) за формулою:

$$X = \frac{2B_E}{B_T - B_E},$$

де:

$B_E$  - площа піка бензолу на хроматограмі випробовуваного розчину (a),

$B_T$  - площа піка бензолу на хроматограмі розчину порівняння (d).

Якщо необхідно, ідентифікація бензолу може бути підтверджена з використанням іншої придатної хроматографічної системи (стаціонарної фази іншої полярності).

Вміст бензолу в субстанції не має перевищувати 0.0002 % (2 ppm) об/об.

На хроматограмі випробовуваного розчину (b) сума площ усіх піків, крім основного і піків метанолу, ацетальдегіду та бензолу, не має перевищувати площу піка 4-метилпентан-2-олу 0.03 % (300 ppm). Не враховують піки, площа яких становить менше 0.03 площі 4-метилпентан-2-олу на хроматограмі випробовуваного розчину (b) 0.0009 % (9 ppm).

**Залізо (2.4.9).** Не більше 0.0001 % (1 ppm). Сухий залишок, одержаний у випробуванні "Сухий залишок", розчиняють у 1 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої, кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину водою  $P$  до позначки і перемішують. 10 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на залізо.

**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.0002 % (2 ppm). 12.0 мл розчину, приготованого для випробування на "Залізо", мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 10 мл еталонного розчину свинцю (2 ppm  $Pb$ )  $P$ .

## О проектах монографий ГФУ «Вода для инъекций», «Вода высокоочищенная» и «Вода очищенная»

Товмасын Е.К.

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы «Монографии на лекарственные субстанции» отдела ГФУ ДП НЭФЦ

Вода является наиболее широко применяемым в фармацевтической промышленности продуктом и может быть как вспомогательным веществом, так и растворителем при синтезе, приготовлении конечного продукта, а так же применяться для растворения или разведения лекарственных средств непосредственно перед использованием. Вода используется для промывки/ополаскивания оборудования и упаковочных материалов. В зависимости от предполагаемого назначения в фармацевтической промышленности используют воду различной степени очистки. Для производства каждого определенного вида лекарственных средств применяется вода определенного качества. Использование определенного типа воды в различных стадиях технологического процесса фиксируется в соответствующих нормативных докумен-

тах. Ниже в виде таблиц приведены обобщенные данные по применению воды различной степени очистки при производстве стерильных, нестерильных лекарственных средств, а также данные по приемлемому качеству используемой воды на различных технологических стадиях производства стерильных, нестерильных лекарственных средств и активных ингредиентов, промывке/ополаскивании оборудования и упаковочных материалов.

В процессе контроля качества воды возникает ряд проблем. Критическим является обеспечение устойчивой микробиологической чистоты, надежное удаление бактерий и бактериальных эндотоксинов. Во всем мире в фармацевтической индустрии прилагаются значительные усилия и расходуются огромные средства по совершенствованию систем

очистки воды и разработки простых, объективных методов оценки качества воды.

Таблица 1

**Приемлемое качество воды, используемой в производстве стерильных лекарственных средств**

Стерильные лекарственные средства	Приемлемое качество используемой воды
Парентеральные	Вода для инъекций
Растворы для гемофильтрации Растворы для гемодиализации	Вода для инъекций
Растворы для перитонеального гемодиализа	Вода для инъекций
Растворы для орошения	Вода для инъекций
Офтальмологические	Вода высокоочищенная
Назальные/ушные	Вода высокоочищенная
Накожные	Вода высокоочищенная

Таблица 2

**Приемлемое качество воды, используемой в производстве нестерильных лекарственных средств**

Нестерильные лекарственные средства	Приемлемое качество используемой воды
Оральные	Вода очищенная
Аэрозоли	Вода очищенная*
Накожные	Вода очищенная
Назальные/ушные	Вода очищенная
Ректальные/вагинальные	Вода очищенная

\* При лечении определенных заболеваний, например цистических фиброзов, лекарственные средства, используемые в виде аэрозолей, должны быть стерильными и апиrogenными. В таких случаях следует использовать воду для инъекций либо воду высокоочищенную стерильную.

Таблица 3

**Приемлемое качество воды, используемой в производстве стерильных активных ингредиентов/лекарственных средств**

Производство	Приемлемое качество используемой воды
Синтез	Вода питьевая / Вода очищенная
Среда ферментации	Вода питьевая / Вода очищенная
Перекристаллизация / перекристаллизация стерильных активных ингредиентов	Вода для инъекций
Использование в составе лекарственного средства до стерильной лиофилизации	Вода для инъекций

Таблица 4

**Приемлемое качество воды используемой в производстве нестерильных активных ингредиентов/лекарственных средств**

Производство	Приемлемое качество используемой воды
Синтез	Вода питьевая / Вода очищенная
Среда ферментации	Вода питьевая / Вода очищенная
Использование в составе лекарственного средства до нестерильной лиофилизации	Вода очищенная
Грануляция	Вода очищенная
Экстракция растительных лекарственных средств	Вода очищенная*

\* допускается применение воды питьевой, если минеральный состав не изменяет состав экстракта

Таблица 5

**Приемлемое качество воды, используемой в промывке/ополаскивании и т.д.**

Промывка/ополаскивание оборудования, контейнеров и упаковки	Приемлемое качество используемой воды
Общее применение, включая очистку на месте (CIP)	Вода очищенная
Первичное ополаскивание контейнеров/упаковки для стерильных лекарственных средств	Вода высокоочищенная
Конечное ополаскивание контейнеров/упаковки для стерильных лекарственных средств для парентерального применения	Вода для инъекций
Конечное ополаскивание контейнеров/упаковки для стерильных непарентеральных лекарственных средств	Вода высокоочищенная

Наиболее широко применяемым методом очистки воды является дистилляция, которая на протяжении длительного времени зарекомендовала себя как достоверный и надежный метод. Этот метод может быть валидирован, поэтому остается официально принятым для получения воды для инъекций. Широко обсуждаются положительные и отрицательные стороны метода двойного обратного осмоса и связанные с этим технологии. Однако Комиссией Европейской Фармакопеи в 1999 году было принято решение о том, что в настоящее время указанный метод невозможно считать достаточно надежным по сравнению с техникой дистилляции для получения воды для инъекций. При применении обратного осмоса сохраняется риск загрязне-

ния мембраны (химическое или биологическое), нарушения целостности мембраны, отсутствия эффективной системы валидации и др. Однако данный метод применим при получении воды высокоочищенной. Метод обратного осмоса допускалось применять при получении воды для инъекции Фармакопеей США (USP 24, с. 1742) и Японской Фармакопеей (JP XIII, 1996, с. 929).

Валидация и контроль очистки воды, системы хранения и распространения являются фундаментальной частью надлежащей производственной практики (GMP) и составляют интегральную часть инспекций GMP.

В фармацевтической промышленности используют воду питьевую. Ниже приведена сравнительная таблица предельно допустимых концентраций содержания основных неорганических веществ по документам ВОЗ, USEPA, ЕС и СанПиН 2.1.4.559-96 (Россия) (информация перепечатана с Web сайта <http://water.ru>) (табл. 6).

Как в Европейскую Фармакопею, так и в ГФУ включаются монографии на «Воду очищенную», «Воду для инъекций», а так же

«Воду высокоочищенную». Монография на «Воду высокоочищенную» включена в ЕФ 4-го изд., которая введена в действие с 1 января 2002 года, для тех фармацевтических продуктов, приготовление которых требует использования воды особого, повышенного биологического качества.

Вашему вниманию представлены проекты монографий Дополнения к ГФУ 1-го издания «Вода очищенная», «Вода высокоочищенная» и «Вода для инъекций», которые являются адаптированными переводами соответствующих статей Европейской Фармакопеи 4-го издания, 2002 г и Дополнения ЕФ 4.2.

Исходные варианты проектов были представлены в отдел ГФУ мл. науч. сотр. лаборатории фарманализа ГП НЭФЦ Харченко С.А.

Ответственный исполнитель по отделу ГФУ - канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Товмасын Е.К.

В обсуждении проектов приняли участие Н.П Хованская (канд. хим. наук, зав. лаб. фармакопейного анализа ГП НЭФЦ), проф. А.И. Гризодуб (зам директора ГП НЭФЦ по научной работе), А.Г. Пиотровская (ученый секретарь ГП НЭФЦ), М.Г. Левин (докт. хим. наук, зав. отд. ГФУ), Е.Г. Жемерова (и.о. зав.

Таблица 6

Вещество	Предельная концентрация, мг/дм <sup>3</sup>			
	ВОЗ	USEPA	ЕС	СанПиН 2.1.4.559-96
Алюминий (Al)	0.2*	0.2 <sup>2</sup>	0.2 <sup>4</sup>	0.5
Азот аммонийный (NH <sub>3</sub> и NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	1.5*	-	0.5 <sup>4</sup>	-
Асбест (миллионов волокон на л)	-	7.0 <sup>1</sup>	-	-
Барий (Ba)	0.7	2.0 <sup>1</sup>	0.1 <sup>6</sup>	0.1
Бериллий (Be)	-	0.004 <sup>1</sup>	-	0.0002
Бор (B)	0.3	-	1.0 <sup>3</sup>	0.5
Ванадий (V)	-	-	-	0.1
Висмут (Bi)	-	-	-	0.1
Вольфрам (W)	-	-	-	0.05
Европий (Eu)	-	-	-	0.3
Железо (Fe)	0.3*	0.3 <sup>2</sup>	0.2 <sup>4</sup>	0.3
Кадмий (Cd)	0.003	0.005 <sup>1</sup>	0.005 <sup>3</sup>	0.001
Калий (K)	-	-	12.0 <sup>5</sup>	-
Кальций (Ca)	-	-	100.0 <sup>6</sup>	-
Кобальт (Co)	-	-	-	0.1
Кремний (Si)	-	-	-	10.0
Литий (Li)	-	-	-	0.03
Магний (Mg)	-	-	50.0 <sup>5</sup>	-
Марганец (Mn)	0.5 (0.1*)	0.05 <sup>2</sup>	0.05 <sup>4</sup>	0.1
Медь (Cu)	2.0 (1.0*)	1.0 <sup>2</sup> -1.3 <sup>1</sup>	2.0 <sup>3</sup>	1.0
Молибден (Mo)	0.07	-	-	0.25
Мышьяк (As)	0.01	0.05 <sup>1</sup>	0.01 <sup>3</sup>	0.05
Натрий (Na)	200.0*	-	200.0 <sup>4</sup>	200.0
Никель (Ni)	0.02	-	0.02 <sup>3</sup>	0.1

Таблица 6 (продолжение)

Вещество	Предельная концентрация, мг/дм <sup>3</sup>			
	ВОЗ	USEPA	ЕС	СанПиН 2.1.4.559-96
Ниобий (Nb)	-	-	-	0.01
Нитраты (NO <sub>3</sub> )	50.0	44.0 <sup>1**</sup>	50.0 <sup>3</sup>	45.0
Нитриты (NO <sub>2</sub> )	3.0	3.3 <sup>1**</sup>	0.5 <sup>3</sup>	3.0
Ртуть (Hg)	0.001	0.002 <sup>1</sup>	0.001 <sup>3</sup>	0.0005
Рубидий (Rb)	-	-	-	0.1
Самарий (Sm)	-	-	-	0.024
Свинец (Pb)	0.01	0.015 <sup>1</sup>	0.01 <sup>3</sup>	0.03
Селен (Se)	0.01	0.05 <sup>1</sup>	0.01 <sup>3</sup>	0.01
Серебро (Ag)	-	0.1 <sup>2</sup>	0.01 <sup>5</sup>	0.05
Сероводород (H <sub>2</sub> S)	0.05 <sup>*</sup>	-	УО <sup>7</sup>	0.03
Стронций (Sr)	-	-	-	7.0
Сульфаты (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	250.0 <sup>*</sup>	250.0 <sup>2</sup>	250.0 <sup>4</sup>	500.0
Сурьма (Sb)	0.005	0.006 <sup>1</sup>	0.005 <sup>3</sup>	0.05
Галлий (Tl)	-	0.002 <sup>1</sup>	-	0.0001
Теллур (Te)	-	-	-	0.01
Фосфор (P)	-	-	-	0.0001
Фториды (F <sup>-</sup> )	1.5	2.0 <sup>2</sup> -4.0 <sup>1</sup>	1.5 <sup>3</sup>	1.5
Хлор, в том числе: - остаточный свободный - остаточный связанный	0.5-5.0 <sup>*</sup>	-	-	0.3-0.5 0.8-1.2
Хлориды (Cl <sup>-</sup> )	250.0	250.0 <sup>2</sup>	250.0 <sup>4</sup>	350.0
Хром (Cr <sup>3+</sup> )	-	0.1 <sup>1</sup>	-	0.5
Хром (Cr <sup>6+</sup> )	0.05	(всего)	0.05 <sup>3</sup>	0.05
Цианиды (CN <sup>-</sup> )	0,07	0.2 <sup>1</sup>	0.05 <sup>3</sup>	0.035
Цинк (Zn)	3.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>2</sup>	5.0 <sup>6</sup>	5.0

\* предел, установленный органолептически и по потребительским качествам воды;

\*\* в пересчете на нитраты и нитриты, соответственно.

1. Обязательные к соблюдению параметры, установленные основным стандартом США (National Primary Water Drinking Regulations).
2. Данный параметр установлен так называемым «вторичным стандартом» США (National Secondary Water Drinking Regulations) и носит рекомендательный характер.
3. Обязательный для соблюдения параметр, согласно «Директивы по качеству питьевой воды...» 98/93/ЕС 1998 года.
4. Индикаторный параметр, согласно «Директивы по качеству питьевой воды...» 98/93/ЕС 1998 года.
5. Обязательный для соблюдения параметр, согласно «Директивы по качеству питьевой воды...» 80/778/ЕС 1980 года.
6. Рекомендованный уровень, согласно EC Drinking Water Directive 80/778/ЕС 1980 года (приводится только для элементов, для которых не установлена предельно допустимая концентрация - МАС (Maximum Admissible Concentration)). Указаны максимальные значения, допустимые в точке пользования.
7. УО (Undetectable Organoleptically) - не должен обнаруживаться органолептически (на вкус и запах) согласно «Директивы по качеству питьевой воды...» 80/778/ЕС 1980 года.

лаб. микробиологии ГНЦЛС), И.И. Юдина (главный специалист ГП НЭФЦ).

В представленных материалах затронуты актуальные вопросы, представляющие интерес для широкого круга специалистов в области производства субстанций и лекарственных средств, а также контроля качества. Обращаем Ваше внимание, что в настоящее время во все ведущие Фармакопеи взамен многочисленных громоздких методов контроля ионного состава получаемой воды включены определения удельной электропроводности и содержания общего органического углерода. К сожалению, данные отечественных производителей по этим показателям практически отсутствуют. Однако дальнейшее затягивание введения данных монографий в ГФУ не представляется возможным.

Просим принять активное участие в обсуждении приведенных проектов и формировании национальной концепции контроля качества воды.

Замечания и предложения к проектам статей Вы можете направлять в адрес ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (отдел ГФУ) или журнала «Фармаком». Приглашаем всех заинтересованных лиц к открытому обсуждению на Форуме сайта журнала «Фармаком» [Farmacomua.narod.ru](http://Farmacomua.narod.ru).

**ВОДА ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ**

Aqua ad iniectabilia

**WATER FOR INJECTIONS**H<sub>2</sub>O

М.м. 18.02

Вода для ін'єкцій - вода, яка використовується як розчинник при приготуванні лікарських засобів для парентерального застосування (вода для ін'єкцій «in bulk») або для розчинення або розведення субстанцій або лікарських засобів для парентерального застосування перед використанням (вода для ін'єкцій стерильна).

**ВОДА ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ  
«IN BULK»**

## ВИРОБНИЦТВО

Воду для ін'єкцій «in bulk» одержують із води питної або води очищеної шляхом дистиляції на обладнанні, частини якого, що контактують із водою, виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підхоженого матеріалу. Обладнання має бути забезпечене ефективним пристроєм для запобігання захоплення крапель. Необхідне належне утримування і технічне обслуговування обладнання. Першу порцію води, одержану на початку роботи, відкидають, потім дистилят збирають.

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Установлюють підхожу межу, що попереджає, і межу, що вимагає вживання заходів, для простежування несприятливих тенденцій. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 10 життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12) в 100 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи не менше 200 мл води для ін'єкцій «in bulk» і густе живильне середовище В. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб.

При виробництві води для ін'єкцій «in bulk» в асептичних умовах може виникнути необхідність встановити більш жорсткі межі, що попереджають.

Визначають питому електропровідність (2.2.38): не більше 1.1  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  при температурі

20 °С; і вміст загального органічного вуглецю (2.2.44): не більше 0.5 мг/л.

Для забезпечення належної якості води слід використовувати валідовані процедури і регулярний контроль питомої електропровідності і мікробіологічної чистоти у процесі виробництва.

Воду для ін'єкцій «in bulk» зберігають і використовують в умовах, що дозволяють запобігти ріст мікроорганізмів і уникнути будь-яких інших забруднень.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина без смаку і запаху.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Вода для ін'єкцій має витримувати вимоги розділу «Випробування на чистоту» води очищеної «in bulk», описані у статті «Вода очищена», а також випробування на бактеріальні ендотоксини.

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Не більше 0.25 МО в 1 мл.

**ВОДА ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ СТЕРИЛЬНА**

Вода для ін'єкцій стерильна - вода для ін'єкцій «in bulk», розфасована у підхожі контейнери, укуповена і стерилізована нагріванням в умовах, які гарантують, що одержаний продукт витримує випробування на бактеріальні ендотоксини. Вода для ін'єкцій стерильна не має містити ніяких доданих речовин.

Вода для ін'єкцій стерильна має бути прозорою і безбарвною.

Кожний контейнер має містити достатню кількість води для ін'єкцій, щоб забезпечити можливість витягання номінального об'єму.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Вода для ін'єкцій стерильна має витримувати вимоги випробувань «Хлориди» (для контейнерів із номінальним об'ємом більше 100 мл), «Сульфати», «Амонію солі», «Кальцій і магній» розділу «Випробування на чистоту» води очищеної в контейнерах, описані в статті «Вода очищена», а також випробування, наведені нижче.

**Кислотність або лужність.** До 20 мл субстанції додають 0.05 мл розчину фенолового

червоного *P*; якщо розчин забарвлюється в жовтий колір, забарвлення розчину має перейти в червоне при додаванні не більше 0.1 мл 0.01 *M* розчину натрію гідроксиду. Якщо ж розчин спочатку забарвлюється в червоний колір, забарвлення розчину має перейти в жовте при додаванні не більше 0.15 мл 0.01 *M* розчину кислоти хлористоводевої.

**Питома електропровідність (2.2.38).** Не більше  $25 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше; не більше  $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

**Речовини, що окислюються.** До 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної *P*, доводять до кипіння, додають 0.2 мл 0.02 *M* розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

**Хлориди (2.4.4).** Не більше 0.00005 % (0.5 ppm) для субстанції в контейнерах із номінальним об'ємом 100 мл або менше. 15 мл субстанції мають витримувати випробування на хлориди. Еталон готують із використанням суміші 1.5 мл еталонного розчину хлориду (5 ppm *Cl*) *P* і 13.5 мл води *P*. Опалесценцію одержаних розчинів порівнюють по вертикальній осі пробірок.

**Сухий залишок.** 100 мл субстанції упарюють насухо на водяній бані і сушать при температурі від 100 °C до 105 °C до постійної маси. Маса сухого залишку не має перевищувати 4 мг (0.004 %) для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше і 3 мг (0.003 %) для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

**Механічні включення: невидимі частки (2.9.19).** Субстанція має витримувати випробування на механічні включення: невидимі частки.

**Стерильність (2.6.1).** Субстанція має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Не більше 0.25 МО в 1 мл.

## ВОДА ВИСОКООЧИЩЕНА

*Aqua valde purificata*

### WATER, HIGHLY PURIFIED

H<sub>2</sub>O

М.м. 18.02

Вода високоочищена призначена для приготування лікарських засобів, коли потрібна вода підвищеної біологічної якості, крім тих випадків, в яких необхідне використання тільки *Vogel* для ін'єкцій.

### ВИРОБНИЦТВО

Воду високоочищену одержують із води питної. У цей час у виробництві використовують метод подвійного зворотного осмосу спільно з іншими підходящими методами, наприклад, ультрафільтрацією і деіонізацією. Необхідне належне утримування і технічне обслуговування системи очищення води.

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Установлюють підхожу межу, що попереджає, і межу, що вимагає вживання заходів, для простежування несприятливих тенденцій. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 10 життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12) у 100 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи не менше 200 мл води високоочищеної і густе живильне середовище *S*. Інкубацію проводять при температурі від 30 °C до 35 °C протягом 5 діб.

Визначають питому електропровідність (2.2.38): не більше  $1.1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  при температурі 20 °C; і вміст загального органічного вуглецю (2.2.44): не більше 0.5 мг/л.

Для забезпечення належної якості води, слід використовувати валідовані процедури і регулярний контроль питомої електропровідності та мікробіологічної чистоти у процесі виробництва.

Воду високоочищену зберігають «in bulk» і використовують в умовах, що дозволяють запобігти ріст мікроорганізмів і уникнути будь-яких інших забруднень.



## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина без смаку і запаху.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції поміщають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л калію хлориду *P*, 0.1 мл розчину дифеніламіну *P* і краплями, при перемішуванні, 5 мл кислоти сірчаної, вільної від азоту, *P*. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °С; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно й аналогічно до випробовуваного розчину з використанням суміші 4.5 мл води, вільної від нітрату, *P* і 0.5 мл еталонного розчину нітрату (2 ppm  $\text{NO}_3$ ) *P*.

**Алюміній (2.4.17).** 10 мкг/л, якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

До 400 мл субстанції додають 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 100 мл води дистильованої *P*. Одержаний розчин має витримувати випробування на алюміній. Як еталон використовують суміш 2 мл еталонного розчину алюмінію (2 ppm *Al*) *P*, 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 98 мл води дистильованої *P*. Як компенсаційний розчин використовують суміш 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 100 мл води дистильованої *P*.

**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.00001 % (0.1 ppm). 200 мл субстанції упарюють у скляній випарювальній чашці на водяній бані до об'єму 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 10 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm *Pb*) *P*.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Не більше 0.25 МО в 1 мл.

## МАРКУВАННЯ

У необхідних випадках зазначають:  
- субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.

## ВОДА ОЧИЩЕНА

Aqua purificata

## WATER, PURIFIED

 $\text{H}_2\text{O}$ 

М.м. 18.02

Вода очищена - це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компетентних уповноважених органів.

## ВОДА ОЧИЩЕНА «IN BULK»

## ВИРОБНИЦТВО

Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підходящим способом.

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Установлюють підходящу межу, що попереджає, і межу, що вимагає вживання заходів, для простежування несприятливих тенденцій. У нормальних умовах підходящою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12) в 1 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи густе живильне середовище В. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб. Кількість зразка для випробування відбирають у залежності від передбачуваного результату.

Визначають вміст загального органічного вуглецю (2.2.44): не більше 0.5 мг/л; або проводять випробування "Речовини, що окислюються" таким чином: до 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної *P*, 0.1 мл 0.02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

Визначають питому електропровідність (2.2.38): не більше 4.3  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  при температурі 20 °С.

Воду очищену «in bulk» зберігають і використовують в умовах, що дозволяють запобігти ріст мікроорганізмів і уникнути будь-яких інших забруднень.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина без смаку і запаху.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції поміщають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л калію хлориду *P*, 0.1 мл розчину дифеніламіну *P* і краплями, при перемішуванні, 5 мл кислоти сірчаної, вільної від азоту, *P*. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °С; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно й аналогічно до випробовуваного розчину з використанням суміші 4.5 мл води, вільної від нітрату, *P* і 0.5 мл еталонного розчину нітрату (2 ppm  $\text{NO}_3$ ) *P*.

**Алюміній (2.4.17).** 10 мкг/л, якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

До 400 мл субстанції додають 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 100 мл води дистильованої *P*. Одержаний розчин має витримувати випробування на алюміній. Як еталон використовують суміш 2 мл еталонного розчину алюмінію (2 ppm Al) *P*, 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 98 мл води дистильованої *P*. Як компенсаційний розчин використовують суміш 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 *P* і 100 мл води дистильованої *P*.

**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.00001 % (0.1 ppm). 200 мл субстанції упарюють у скляній випарювальній чашці на водяній бані до об'єму 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 10 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) *P*.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Не більше 0.25 МО в 1 мл, якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## МАРКУВАННЯ

У необхідних випадках зазначають:

- субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.

## ВОДА ОЧИЩЕНА В КОНТЕЙНЕРАХ

Вода очищена в контейнерах - це вода очищена «in bulk», розфасована у підходжі контейнери, яка зберігається в умовах, що забезпечують мікробіологічну чистоту, що вимагається, і яка не містить ніяких доданих речовин.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина без смаку і запаху.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Вода очищена в контейнерах має витримувати вимоги розділу «Випробування на чистоту» води очищеної «in bulk», а також випробування, наведені нижче.

**Кислотність або лужність.** До 10 мл субстанції, свіжопрокип'яченої у пробірці з боросилікатного скла і охолодженої, додають 0.05 мл розчину метилового червоного *P*; одержаний розчин не має забарвлюватися в червоний колір. До 10 мл субстанції додають 0.1 мл розчину бромтимолового синього *P1*; розчин не має забарвлюватися в синій колір.

**Речовини, що окислюються.** До 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної *P*, додають 0.1 мл 0.02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

**Хлориди.** До 10 мл субстанції додають 1 мл кислоти азотної розведеної *P* і 0.2 мл розчину срібла нітрату *P2*; протягом 15 хв не має бути видимих змін розчину.

**Сульфати.** До 10 мл субстанції додають 0.1 мл кислоти хлористоводневої розведеної *P* і 0.1 мл розчину барію хлориду *P1*; протягом 1 год не має бути видимих змін розчину.

**Амонію солі.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). До 20 мл субстанції додають 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного *P*; через 5 хв забарвлення одержаного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно до випробовуваного розчину додаванням 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного *P* до суміші 4 мл еталонного розчину амонію (1 ppm  $\text{NH}_4$ ) *P* і 16 мл води, вільної від аміаку, *P*.

**Кальцій і магній.** До 100 мл субстанції додають 2 мл аміачного буферного розчину рН 10.0 *P*, 50 мг протравного чорного 11 індика-

торної суміші Р і 0.5 мл 0.01 М розчину натрію едетату; з'являється слабо-синє забарвлення.

**Сухий залишок.** 100 мл субстанції упарюють насухо на водяній бані і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси. Маса сухого залишку не має перевищувати 1 мг (0.001%).

**Мікробіологічна чистота.** Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів

(2.6.12) має бути не більше  $10^2$  в 1 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи густе живильне середовище В.

#### МАРКУВАННЯ

У необхідних випадках зазначають:  
- субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.

## Міжнародні конгреси, семінари, виставки

Маслова Н.Ф., Чайка Л.А., Либина В.В., Пивень Е.П.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

### Информация о IX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство»

Очередной IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» проходил в г. Москве с 8 по 12 апреля 2002 года.

Организаторами Конгресса являлись Министерство здравоохранения РФ, Российская Академия наук, Российская Академия медицинских наук, Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», Российское земское движение. Спонсорами Конгресса стали известные фармацевтические компании: «Сервье» (генеральный спонсор), «Берлин-Хеми», «Акрихин», «Пфайзер» (главные спонсоры), «АБОЛмед», «Байер АГ», «Бристол-Майерс Сквибб», «Гедеон Рихтер», «ГлаксоСмитКляйн», «Мерк Шарп Доум», «Никомед Дистрибьюшн Сентэ», «Сановисинтеллабо», «Эгис», «Фармация», «Хоффман-Ля Рош», «Хемофарм».

Подобные конгрессы проводятся с 1992 года и являются по своей организационной форме, цели, задачам и широчайшему охвату проблематики уникальным событием международного масштаба. В работе Конгресса принимали участие 34 научных общества РФ, 41 зарубежная фармацевтическая компания, представители Фармакопеи США. Особую ценность конгрессам придают доклады и лекции ведущих специалистов высочайшего уровня, нередко с мировой известностью, приглашенных из различных учреждений России и других стран (США, Англии, Германии, Франции, Италии, и др.).

Почетным Президентом предыдущих и нынешнего, IX Конгресса, был академик Ми-

хаил Давыдович Машковский, Президентом — известный клиницист-пульмонолог, ученый и организатор здравоохранения академик Александр Григорьевич Чучалин.

В отличие от традиционных съездов и конференций по специализированным направлениям медицины, главная цель конгрессов «Человек и лекарство» состоит в ознакомлении как можно более широкого круга практических и научных работников всех областей медицины и фармации с современными методами фармакотерапии и профилактики важнейших болезней человека. Наряду с этим значительное место в программах всех конгрессов занимают перспективные концепции создания новых лекарственных средств, гармонизация с мировыми стандартами фармакотерапии, вопросы доказательной медицины, деятельность контрольно-разрешительной системы по лекарствам в России, организация и деятельность фармацевтического рынка, современные информационные технологии в медицине и фармации и др.

Отсюда понятна широкая финансовая поддержка этого и предыдущих конгрессов мировыми фармацевтическими компаниями, которые осуществляют рекламу своей продукции на многочисленных мероприятиях и выставках с участием работников практической медицины и фармации. По данным Президента Конгресса академика А.Г. Чучалина во всех мероприятиях IX Конгресса приняло участие свыше 34 тыс. человек.

Основные направления работы IX Конгресса:

- Стратегия профилактики основных заболеваний человека и место лекарственных средств в ее достижении.

- Рациональная фармакотерапия основных заболеваний человека. Дальнейшее развитие формулярной системы в России.

- Клинические рекомендации и национальные руководства по наиболее распространенным заболеваниям человека.

- Генетические аспекты фармакологии.

- Лекарства будущего.

- Гармонизация в сфере лекарственного обращения.

Программа IX Конгресса освещалась в 9 пленарных докладах и актовых лекциях, посвященных наиболее значительным достижениям и стратегическим концепциям в области здравоохранения и использования лекарственных средств, а также на 145 симпозиумах по актуальным вопросам фармакотерапии широкого круга болезней человека, каждый из которых включал от 4 до 10 лекций. Наряду с этим проводились семинары, дискуссии, лекции и школы для практических врачей, конкурсы молодых ученых и ряд других мероприятий, главным образом, по вопросам современной фармакотерапии.

Наиболее обсуждаемыми на Конгрессе были темы, касающиеся фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, воспаления и боли, заболеваний легких, нервно-психических болезней, инфекционных заболеваний, онкологических болезней, заболеваний печени и желудка.

На открытии Конгресса с большим, почти 30-минутным докладом, выступил академик М.Д. Машковский, которому исполнилось 94 года. Он обратил внимание на роль лекарств в улучшении качества жизни населения и привел данные американских коллег, в соответствии с которыми улучшение качества и продолжительности жизни на 44 % связано с использованием лекарственных препаратов. Значительную часть доклада М.Д. Машковский посвятил вопросам дороговизны лекарств и недобросовестной политике фармацевтических заводов в ценообразовании. Особое внимание он уделил проблеме практически полного прекращения производства отечественных фармакологических субстанций и переключению российских предприятий на выпуск готовых лекарственных форм из субстанций зарубежных, глав-

ным образом, китайских производителей. Резко сократилась разработка и производство оригинальных отечественных препаратов. Ведущие российские научно-исследовательские институты испытывают огромные трудности с финансированием, из них уходят лучшие научные кадры.

На открытии Конгресса выступил также генеральный менеджер компании «Сервье» в России. Он отметил, что этой компанией за последние 27 лет создано 30 оригинальных препаратов. 25 % оборотного капитала компания реинвестирует в научные исследования. В научно-исследовательском центре компании работает 2400 сотрудников из общей численности 13600 человек. Указанное позволяет обеспечивать ежегодный прирост оборота на 15 % и реализовывать продукцию в 140 странах.

Современные концепции фармакотерапии воспаления и боли с помощью нестероидных противовоспалительных средств — ненаркотических анальгетиков были представлены на ряде симпозиумов: «Новое в лечении и профилактике боли», «Боль в спине как насущная проблема человечества — современные подходы к патогенетическому лечению», «Ненаркотические анальгетики в лечении болевых синдромов», «Применение нестероидных противовоспалительных препаратов в терапии, ревматологии и неврологии», «Безопасные нестероидные противовоспалительные препараты — стратегия современной ревматологии» и др.

Эти симпозиумы проходили под председательством и с участием ведущих ученых-клиницистов (Насоновой В.А., Насонова Е.Л., Осиповой Н.А., Ольбинской Л.И., Вейн А.М., Новикова Г.А., Балабановой Р.М. и др.), что подчеркивает высокую значимость и актуальность указанной проблемы для медицины, фармации и фармакологии. Данная проблема представляет особый интерес и для специалистов ГНЦЛС, т.к. создание и внедрение в клиническую практику препаратов противовоспалительного и анальгетического действия в разных лекарственных формах традиционно было и остается одним из приоритетных научно-прикладных направлений Центра.

Сегодня на фармацевтическом рынке нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) — самая распространенная группа лекарственных средств: перечень одних только фармакологических субстанций для их производства насчитывает почти 20

наименований. В США ежегодно продают 1 млрд. упаковок НПВП на сумму более 35 млн. долларов.

Все большую известность среди врачей и пациентов приобретают представители нового поколения НПВП — селективные ингибиторы ЦОГ-2, которые постепенно приходят на смену традиционным НПВП — ингибиторам ЦОГ-1, в первую очередь, в ревматологии. В свете последних открытий о патогенетических факторах воспаления и мишенях лекарственного воздействия, вероятно, следует отказаться от общего названия «НПВП» и разделить эту группу лекарств, по крайней мере, на две: «селективные ингибиторы ЦОГ-2 или ЦОГ-1-сберегающие» препараты и «неселективные ингибиторы ЦОГ».

В разработках ведущих зарубежных компаний четко прослеживается стремление к поиску новых, более безопасных НПВП и к повышению безопасности анальгетической терапии путем оптимизации вида или состава лекарственных форм традиционных НПВП.

Не теряют актуальности и вопросы особенностей фармакотерапии боли и воспаления с применением «стандартных» НПВП — диклофенака, кетопрофена, напроксена.

Вопросы эффективности и безопасности лекарственных средств и, в частности, НПВП все больше рассматриваются с позиций доказательной медицины. На важную роль и необходимость развития именно такого подхода при изучении препаратов обращал внимание акад. Чучалин А.Г. в своих пленарном и секционных докладах.

Ключевой темой Конгресса явилась также проблема фармакотерапии заболеваний сердечно-сосудистой системы, которая была представлена более чем 20 научными симпозиумами, а также лекциями и школами для врачей. С участием ведущих российских кардиологов, а также специалистов из других стран с позиций доказательной медицины были рассмотрены современные достижения в области патогенеза, клинической фармакологии, фармакотерапии, включая стандарты медикаментозной терапии и фармакоэкономики лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В научных симпозиумах нашли отражение все основные направления в кардиологии. Под председательством и при непосредственном участии Чазова Е.И., Грацианского Н.А., Беленкова Ю.Н., Карпова Р.С., Мартынова А.И., Оганова Р.Г., Мареева В.Ю.

и других ведущих кардиологов обсуждались перспективные направления и особенности медикаментозного лечения артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, включая острый коронарный синдром, метаболический синдром, нарушений ритма сердца, сердечной недостаточности. Широко была представлена информация о последних достижениях в области фармакологии сердечно-сосудистых средств: бета-адреноблокаторов, ингибиторов АПФ, блокаторов рецепторов ангиотензина П, антагонистов кальция, статинов, донаторов оксида азота и др.

Обсуждались также новые и спорные вопросы в этой области, а также нецелесообразность применения отдельных лекарственных средств, которые ранее активно продвигались на фармацевтические рынки. В частности, отдельный симпозиум был посвящен критическому анализу клинического применения антиоксидантов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Показано, что витамины А, Е, С и каротиноиды не лечат, а только осложняют процесс лечения, повышая общую смертность и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний у таких пациентов, а также повышая риск онкологических заболеваний. Возможная причина этого — перекисное окисление липидов (ПОЛ), которое блокирует действие указанных препаратов.

Компанией «Байер» снят с продвижения на рынке церивастатин (байкол), чрезвычайно эффективный ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы, но вызывающий рабдомиолиз и, вследствие этого, смертельные исходы.

Проблема лечения кислотзависимых заболеваний желудка на данном Конгрессе сместилась в сторону гастро-эзофагальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), которая приобретает все большее распространение во всем мире. На специальном симпозиуме по этой теме выступил известный клиницист-исследователь из Швеции Л. Лунделл. ГЭРБ серьезно ухудшает качество жизни и трудоспособность пациентов, осложняется по не выясненным причинам неспецифическим астматическим кашлем, ларинго-фарингитами, при неправильном лечении — раком пищевода. Полагают, что лучшим средством фармакотерапии ГЭРБ является назначение ингибиторов протонного насоса. Среди них наиболее эффективным признан эзомепразол (нексиум), отличающийся от «золотого стандарта» - омепразола более быстрым развити-

ем непосредственного эффекта и более стойким отдаленным эффектом.

Актуальным был симпозиум «Оптимизация методов диагностики и лечения заболеваний органов пищеварения: клинические рекомендации и стандарты лечения», проводимый Григорьевым П.Я.. Доклады на нем были посвящены «Заболеваниям билиарной системы» (Максимова В.А.), «Заболеваниям толстой кишки» (Румянцева В.Г.) и др. Подчеркнуто, что в лечении язвенного колита препаратами первой линии являются аминосалицилаты, затем кортикостероиды и, по европейским требованиям, обязательным является применение циклоспорина А. При болезни Крона препаратами первой линии продолжают оставаться кортикостероиды, бутисалид и флексима (последний появился в медицинской практике 5 лет назад).

Интересным для врачей по специальности «Гастроэнтерология» был курс лекций «Современные подходы к диагностике и лечению хронического панкреатита». Особо следует отметить доклад Минушкина О.Н. «Кому показана заместительная терапия ферментами поджелудочной железы. Результаты мета-анализа». В докладе указывалось на эффективность креона в новой лекарственной форме минимикросферы в капсулах, которые обладают более высокой эффективностью по сравнению с микросферами креона. Указанный препарат в новой форме показан больным с алкогольно-индуцированным панкреатитом и первичной недостаточностью поджелудочной железы; с синдромом Швахмана-Даймонда (второе по частоте наследственное заболевание, приводящее к развитию экзокринной недостаточности поджелудочной железы).

Значительная часть мероприятий Конгресса была посвящена современным методам фармакотерапии в неврологии и психиатрии. В частности, большое внимание уделялось фармакотерапии инсомний (нарушений сна), как одному из важнейших факторов современности, влияющих на здоровье и качество жизни населения. Четко доказано, что традиционные подходы с использованием барбитуратов или бенздиазепиновых нейролептиков себя не оправдали по ряду причин, прежде всего из-за того, что их систематический прием, в действительности, приводит к усугублению инсомний, а также вызывает другие побочные эффекты. Полагают, что если сон длится не менее 6 час в сутки, то

применять специальные средства вообще не следует. Но если снотворная терапия все-таки показана, то впервые начинать лечение следует с наиболее безвредных препаратов растительного происхождения. Среди синтетических средств следует использовать ивадал (золпидем) — короткоживущее снотворное средство нового химического класса, которое отвечает всем требованиям эффективной и безопасной терапии инсомний различного генеза: препарат является специфическим агонистом  $\omega_1$ -рецепторов ГАМК-А-рецепторного комплекса, ускоряет засыпание, повышает продолжительность сна и улучшает его качество.

Как и на предыдущем Конгрессе, большое внимание было уделено проблемам дефицита и перегрузки организма железом в клинической практике. По данным ВОЗ, до 20 % населения Земли страдает железодефицитной анемией, но наиболее актуальна эта проблема в акушерстве и педиатрии. Так, Брейманн Ч. (Швейцария) в докладе поднял вопросы дефицита железа при беременности и развитии, в связи с этим, негативных последствий у плода. Суточная потребность железа для беременных составляет 60 мг. Применение препаратов железа в больших дозах может вызывать побочные действия и не обеспечивает терапевтического эффекта. Особое внимание в докладе было уделено препарату венофер. Сметаниной Н.С. сделан доклад «Диагностика и лечение первичной и вторичной перегрузки железом», в котором она указала на наличие трансферритиновых рецепторов и обозначила критерии начала хелаторной терапии (десферал, подкожно) при перегрузке железом. Клинически перегрузка организма железом проявляется поражением печени (гепатиты), гемахроматозом (кожа серо-грязная), повреждением сердца и диабетом. Доклады также были сделаны Черновым В.М. «Применение внутривенных препаратов железа в клинической практике» и Румянцевым А.Г. «Фармакоэкономический анализ лечения железодефицитной анемии».

Темой трех симпозиумов, на которых высказывались иногда диаметрально противоположные оценки, были биологически активные пищевые добавки (БАД). Так, по мнению представителя РФ в ВОЗ Лепехина В.К., БАД — это «цунами», захлестнувшее Россию. Многие БАД, запрещенные к применению в цивилизованных странах, бесконтрольно ввозятся и применяются в России, хотя час-

то они содержат тяжелые металлы, дигиталис, наркотические вещества и психостимуляторы. Безапелляционную поддержку БАД получили на другом симпозиуме, который проводился под эгидой соответствующей российской ассоциации. Компромиссная позиция по отношению к БАД высказывалась на симпозиуме по применению БАД в спорте высоких достижений.

Работа симпозиума «Лекарственные средства: качества и информация», проходила под руководством Вильямса Роджера (США), Чучалина А.Г., Шашковой Г.В. В выступлении Лепехина В.К. была освещена проблема роста числа фальсифицированных препаратов. При этом он указал на недостаточную фармакологическую подготовку специалистов и недостаточную ориентацию на мониторинг лекарств.

В докладе Вильямса Р. было отмечено, что качество пищевых добавок никем не регламентируется, и в их составы введены до 40 % сильнодействующих лекарственных средств.

Вильямс Р. уделил внимание проведению международной конференции по гармонизации (ICN). В докладе было также отмечено, что в США четко различают брендовые препараты и препараты-генерики. По качеству и эффективности генерики должны соответствовать брендовым препаратам, но их стоимость на фармацевтическом рынке на 50 % ниже. Для препаратов-генериков должна соблюдаться фармацевтическая и терапевтическая эквивалентность и биоэквивалентность. Борьба с фальсификацией лекарственных средств — это четкое направление FDA, в случае нарушения применяется действенная мера — штрафы.

Интересен был доклад Блум Н. (США), в котором была изложена программа Фармакопей США по информации и обеспечению качества лекарственных средств (USPDI).

Значительный интерес вызвал симпозиум «Оригинальные и воспроизводимые лекарственные средства: прошлое, настоящее и будущее». На нем выступили директор ВНЦ БАВ (Купавна) Сернов Л.Н., фармакологи, технологи и аналитики этого Центра и представители двух заводов России — «Акрихин» и «Верофарм». ВНЦ БАВ работает, в основном, с тремя заводами России, с которыми за 7 лет смог разработать и внедрить 8 оригинальных препаратов. Остальные разработки Центра — это генерики, которых за последние 8 лет разработано около 50. Освещены

требования к объему доклинических фармакологических исследований препаратов-генериков в РФ. Генерики должны сравниваться только с брендовыми (оригинальными) препаратами. Неоднократно подчеркнута, в принципе, важная позитивная роль работ по генерикам для поддержания научного потенциала в ВНЦ БАВ. На указанных заводах все технологии по генерикам патентуются. В связи с этим имеется уже несколько судебных исков к другим заводам России.

Вместе с тем, из выступлений представителей заводов стало ясно, что стратегия в определении номенклатуры производимых лекарственных средств не отличается от той, которая существует в Украине.

В РФ зарегистрировано более 13 тыс. лекарственных средств, из которых более 5 тыс. производятся отечественными заводами. С 2005 года, согласно решениям МЗ РФ, заводы РФ должны перейти на производство с соблюдением правил GMP. При рассмотрении регистрационных досье особое внимание уделяется контролю на наличие в препаратах красителей (амарант, тартразин и др.), диэтиленгликоля, L-триптофана, фенола, антиоксидантов.

В докладе Юрченко («Акрихин») было отмечено, что перед промышленностью поставлены следующие задачи:

- обновление номенклатуры выпускаемых лекарственных средств;
- организация производства субстанций;
- перевод химико-фармацевтической промышленности на требования GMP;
- обеспечение качества выпускаемой продукции;
- разработка и освоение новых оригинальных препаратов.

В докладе Березовской И.В. «Методология доклинического изучения безопасности генериков» были выделены следующие моменты: генерики могут представлять опасность из-за низкого качества субстанции, фальсификации лекарственных препаратов, несоответствия их современным требованиям, из-за обнаружения новых побочных реакций, низкого качества вспомогательных веществ.

Не осталась без внимания на Конгрессе проблема развития производства фитопрепаратов и фитотерапии. На одном из симпозиумов, посвященных этой проблеме, В.А. Быков отметил, что работа ВИЛАР строится на основе конвенции ООН по биоразнообразию растительного сырья и его сохранению. 127

наименований дикорастущих растений официально разрешены к медицинскому применению в России. Россия имеет и скрытые возможности использования растительного сырья — это растения других стран. В народной медицине используется 200 наименований растений, в мире — 2000 наименований, т.е. имеются потенциальные возможности. Докладчик отметил также необходимость развития гомеопатии; «соковых» технологий (переработка растительного сырья в месте произрастания). При разработке фитохимических препаратов 10 % времени затрачивается на исследование специфической активности, а 90 % — на создание препарата. Докладчик отметил, что при доклиническом изучении необходимо уделять большое внимание не только фармакологической активности, но и безопасности фитохимических препаратов.

На симпозиуме «Современные проблемы фитотерапии и фитотерапии», проводимого под руководством Багировой В.А. и Быкова В.А., речь шла об анализе номенклатуры и состоянии уровня стандартизации фитопрепаратов, поиске и разработке новых фитопрепаратов, особенностях применения фитопрепаратов антимикробного и противовирусного действия.

На базе НИИ физико-химической медицины МЗ РФ при участии его ведущих специалистов, а также директора лаборатории прикладной фармакокинетики Университета Южной Калифорнии (США) проф. Джеллифа Р. прошел научно-образовательный семинар на тему «Принципы фармакокинетики и популяционное фармакокинетическое/фармакодинамическое (ФК/ФД) моделирование. Приложение к оптимизации терапевтического лекарственного мониторинга и индивидуализации фармакотерапии». На семинаре были рассмотрены основные принципы фармакокинетического популяционного моделирования и представлен пакет прикладных программ USC·PASC, разработанный в лаборатории прикладной фармакокинетики УЮК (США) для проведения популяционного ФК/ФД моделирования и оптимизации фармакотерапии на основе данных терапевтического лекарственного мониторинга. В состав пакета USC·PASC входят программы для параметрического и непараметрического популяционного моделирования, позволяющие по данным ФК/ФД исследований строить плотности распределения значений параметров выбранной модели и рассчитать статис-

тические показатели полученного распределения. Полученные распределения параметров ФК модели лекарственного средства и их статистические моменты могут быть введены в программу MB, входящую в пакет USC·PASC, и использоваться для расчета на их основе индивидуальных режимов дозирования. Кроме того, такие распределения позволяют выявить в изучаемой группе пациентов, а также в группе экспериментальных животных подгруппы с резко отличающимися значениями ФК/ФД параметров. Использование данного подхода особо важно при изучении ФК и индивидуализации фармакотерапии большой группы лекарственных средств (антибактериальные, сердечно-сосудистые, химиотерапевтические и др. препараты).

Актуальным вопросам фармакокинетики был посвящен симпозиум «Биодоступность лекарственных средств». Он проходил под председательством зав. лаб. фармакокинетики Научного центра психического здоровья РАМН, д-ра мед. наук Мирошниченко И.И. В симпозиуме приняли участие ведущие ученые в области фармакокинетики и эксперты Фармакологического комитета МЗ РФ Фирсов А.А., Стародубцев А.К., Родионов А.П., Бондарева И.Б. и др.

В докладе проф. Фирсов А.А. подробно изложил основные требования и правила изучения биоэквивалентности лекарственных средств в соответствии с «Методическими рекомендациями по проведению качественных исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов», разработанными и утвержденными МЗ РФ во II полугодии 2001 года. Этот доклад представляет особый интерес, так как в настоящее время в процессе разработки находятся соответствующие методические рекомендации ГФЦ МЗ Украины, которые, в связи с процессом гармонизации требований к исследованию новых лекарственных средств в рамках СНГ, по основным критериям должны быть согласованы с российской документацией.

В отличие от «Методических рекомендаций ...» МЗ РФ 1995 года, во вновь утвержденном документе особое внимание уделено отбору и обследованию добровольцев, а также этическим аспектам исследований биоэквивалентности (БЭ). Оценка БЭ всех препаратов проводится только на здоровых добровольцах при строгом соблюдении и контроле этических норм. Исключение составляют ле-



карственные средства, применяемые при ВИЧ-инфекциях, противоопухолевые и психотропные препараты. Перед исследованием БЭ добровольцы кроме «стандартных» лабораторных тестов дополнительно обследуются на ВИЧ-инфекцию, сифилис, вирусный гепатит, женщины также на беременность.

Фирсов А.А. особо остановился на критериях, определяющих численность добровольцев в исследовании, которая, по новым требованиям, зависит от вариабельности фармакокинетических параметров, но при этом не должна быть менее 18 человек. Изменились также и требования к математическим и статистическим подходам при анализе фармакокинетических данных и заключении о БЭ сравниваемых препаратов. В качестве одного из обязательных документов при организации и проведении испытаний на БЭ является Программа проведения исследований, утверждаемая председателем Комиссии по клинической фармакологии НЦЭГКЛС МЗ РФ, основные требования к которой также представлены в «Методических рекомендациях ...».

Следующим докладом, носившим установочный характер, явилось сообщение д-ра мед. наук Мирошниченко И.И. «Методы оценки биодоступности *in vitro* и *in vivo*». Вопрос о корреляции результатов изучения биодоступности методами *in vitro* и *in vivo*, всегда являясь дискуссионным, очень часто возникает при разработке лекарственных средств в новых лекарственных формах и при изменении состава вспомогательных веществ в лекарственной форме. В ходе доклада и его активного обсуждения на симпозиуме присутствующие специалисты пришли к выводу о недопустимости подмены исследования биодоступности *in vivo* данными, полученными *in vitro*. В каждом конкретном случае степень корреляции между ними необходимо устанавливать экспериментально.

Важным с точки зрения методологии фармакокинетики был доклад проф. Стародубцева А.К. «Методические аспекты изучения биоэквивалентности лекарственных средств». Отмечая, что для испытаний на БЭ препаратов могут быть использованы различные методы — физико-химические, иммунологические, микробиологические и др., но при этом они должны обеспечивать возможность контроля концентрации препарата в крови или других биологических жидкостях и отвечать требованиям избирательности,

точности, воспроизводимости. В отчетных материалах обязательно представление метрологических характеристик методики и экспериментальные данные, подтверждающие ее соответствие перечисленным характеристикам.

В докладе проф. Родионова А.П. «Взаимосвязь фармакодинамики с фармакокинетикой и биодоступностью» были представлены результаты ряда исследований, свидетельствующие о достаточно высокой степени корреляции ФК/ФД характеристик препаратов, в частности сердечно-сосудистого действия.

В целом, можно заключить, что на научном симпозиуме «Биодоступность лекарственных средств» на основании экспериментальных данных, а также на основе зарубежной информации был проведен достаточно всесторонний анализ современных подходов и значения изучения фармакокинетики лекарственных средств. Были рассмотрены вопросы: о значении экспериментальных и клинических фармакокинетических данных для разработки препаратов, в т.ч. оригинальных и препаратов-генериков, о роли исследований биоэквивалентности для оценки качества разрабатываемых генерических аналогов, о роли клинических фармакокинетических исследований для оптимизации индивидуальной фармакотерапии, а также о значении фармакокинетического взаимодействия при комплексной терапии.

В настоящее время в России, также как и в некоторых зарубежных странах, значительное внимание уделяется фармакоэкономическому анализу, как основе рационального использования лекарственных средств и медицинских технологий. Это связано с тем, что контроль бюджетных затрат на медицинское обслуживание в настоящее время представляет собой основу политики в области здравоохранения при принятии решений по распределению ресурсов, анализе последствий применения новых и существующих лекарственных средств как с точки зрения их терапевтической эффективности, так и затрат. Потребители лекарственных средств настаивают на подтверждении в денежном выражении ценности конкурирующих между собой технологий, особенно это относится к новым лекарственным препаратам, с тем, чтобы принять оптимальное решение о включении препарата в перечень жизненно необходимых лекарственных средств. В этих условиях

оценка экономической эффективности лекарственной терапии становится важным инструментом выбора тех или иных лечебных средств медицинскими учреждениями и сторонами, оплачивающими их услуги.

На конгрессе проф. Воробьевым П.А. подчеркивалось, что существует пять основных видов фармакоэкономической оценки лекарственных средств:

- анализ стоимости лечения;
- анализ минимизации затрат;
- анализ затраты-эффективность;
- анализ затраты-полезность (учитывается

мнение пациента о достигнутых результатах лечения с точки зрения их полезности);

- анализ затраты-выгода (польза). При расчете по этому способу как прямые медицинские затраты, так и результаты лечения оцениваются в денежных единицах.

В России наибольшее развитие получил метод фармакоэкономической оценки «затраты-эффективность», а для препаратов-генериков — «минимизация затрат».

Один из докладов на конгрессе был посвящен вопросам моделирования в фармакоэкономических исследованиях. Математическое моделирование клинических ситуаций используется при наличии неполной или недостаточно достоверной клинической или социальной информации о результатах медикаментозного лечения, что позволяет путем экспертной оценки дополнять эту информацию. Наиболее часто в качестве модели используется дерево решений, что предполагает наличие как минимум 2-х решений при выборе медикаментозной терапии с соответствующей частотой побочных эффектов (при этом известна стоимость лечения). В ряде стран моделирование является официальной частью процедуры включения препарата в список жизненно необходимых лекарственных средств.

В настоящее время в России ведется работа над Протоколом ведения больных, в котором наряду с терапевтической эффективностью и безвредностью будет отражаться экономическая эффективность.

Результаты фармакоэкономических исследований препаратов группы ингибиторов АПФ, проведенные в московских клиниках, показали, что наиболее часто применяемым препаратом является периндоприл. Этот препарат также является препаратом выбора по своей терапевтической эффективности и стоимости лечения (фармакоэкономика).

Хорошие результаты с точки зрения фармакоэкономики также показал лизиноприл. Снижение уровня смертности при лечении лизиноприлом у лиц старше семидесяти лет составляет 9.5 %, снижение уровня госпитализации (при высоких дозах лизиноприла) — составляет 24 %. Данный препарат не вызывает ухудшения функции почек у больных. Лизиноприл также предотвращает утреннее повышение артериального давления, а при применении эналаприла такой эффект практически не наблюдается. Установлено, что в результате проведения комплексной терапии перспективной является комбинация лизиноприла и амлодипина.

В ряде докладов на конгрессе затрагивался вопрос ценообразования на лекарственные средства. Отмечалось, что преимущественно заявительный характер регистрации цен на жизненно необходимые и важнейшие лекарственные средства не способствует сдерживанию их роста. Также не способствует снижению цен и отсутствие четких и прозрачных критериев и процедуры (методики) проведения экспертизы цен.

Значительное внимание на конгрессе было уделено вопросу внедрения формулярной системы в практическое здравоохранение. Это связано с тем, что формулярная система гарантирует обеспечение пациентов качественным лечением; определяет и разрабатывает методы рациональной фармакотерапии распространенных заболеваний; гарантирует использование наиболее клинически и экономически эффективных и безопасных лекарственных средств; обеспечивает контроль за правильным их использованием; обеспечивает широкое распространение объективной информации, основанной на принципах доказательной медицины, среди работников здравоохранения. Формулярная система в мировой практике адресно направлена, в первую очередь, врачам первичного звена, в России — участковым, цеховым врачам и врачам общей практики. Конечная цель внедрения формулярной системы в России — повышение профессионального уровня врачей, который позволил бы им самостоятельно разрешать многие клинические проблемы, не прибегая лишней раз к помощи узких специалистов (кардиологов, пульмонологов и др.). На конгрессе были приведены данные о частоте консультаций врачей общей практики узкими специалистами по странам мира:

- Великобритания — 7%;

- Франция — 4%;
- США — 5%;
- Россия — более 30%.

Академиком Чучалиным А.Г. в докладе было отмечено, что Россия — второй в мире (после Великобритании) стала на регулярной основе один раз в год выпускать Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). В настоящее время вышел третий выпуск данного справочника, в котором, в отличие от предыдущего, появились две новые главы: «Лекарственные средства, применяемые в неврологии» и «Лекарственные средства, применяемые в оториноларингологии». Включение любого препарата в формуляр основано на принципах доказательной медицины и обязательном предоставлении фирмой результатов о фармакоэкономических исследованиях.

В России также выпущен справочник по доказательной медицине (перевод английского издания), содержащий информацию об эффективности лечебных и профилактических вмешательств, который также будет ежегодно обновляться. По каждой отдельной проблеме даются сведения об эффективности проводимых вмешательств. Для каждого вмешательства сообщается, насколько оно полезно (например, какова вероятность выздоровления или увеличения продолжительности жизни больного) и как достоверны имеющиеся сведения.

В рамках Конгресса проходила выставка лекарственных средств, изделий медицинского назначения, современных информационных технологий, а также специализированных изданий. На выставке была представлена продукция около 200 крупнейших зарубежных компаний-производителей фармацевтической и медицинской продукции.

Участникам Конгресса были предоставлены тезисы докладов IX Конгресса, а также полные материалы предыдущего, VIII Конгресса, в виде трех монографий: «Фармакотерапия заболеваний сердечно-сосудистой системы», «Фармакотерапия в неврологии и психиатрии», «Профилактика, диагностика и фармакотерапия некоторых инфекционных заболеваний». Кроме того, представлялась возможность приобрести разнообразные информационные материалы: справочные издания по лекарствам и биологически активным добавкам, Федеральное руководство для вра-

чей по использованию лекарственных средств, материалы по фармакологии и клиническому применению лекарств и др.

Таким образом:

1. Ежегодный Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» является широкомасштабным научно-образовательным форумом, участие в котором позволяет получить обзорную информацию и высказать мнение ведущих российских и зарубежных специалистов-клиницистов, фармакологов и организаторов здравоохранения по широкому спектру современных направлений и проблем в различных областях медицины, а также определить приоритетные тенденции развития фармакологии и фармации. Подобных по направленности и разносторонности тематики, высокому научному уровню и масштабности мероприятий в Украине и в странах Запада не проводится.

2. Информация, полученная на Конгрессе, позволяет определить оптимальные направления и конкретные объекты в разработке новых препаратов и выйти с соответствующими предложениями как по производству препаратов-генериков, так и в проведении поисковых исследований по созданию новых оригинальных лекарственных средств.

3. В России и за рубежом, в целом, экспериментальная и клиническая фармакокинетика продолжают активно развиваться и являются важной неотъемлемой частью научных исследований и разработки новых оригинальных и препаратов-генериков, а также одним из основных медико-биологическим методом оценки качества лекарств.

4. Внедрение формулярной системы в практическое здравоохранение обеспечивает широкое распространение среди работников здравоохранения объективной информации о лекарственных средствах на принципах доказательной медицины.

5. Признается роль и социальное значение государственного регулирования цен на лекарственные средства. Представляется целесообразным более широко использовать фармакоэкономические исследования на более ранних этапах жизненного цикла лекарственных средств — например, на этапе прохождения клинических испытаний и выхода на рынок, а также в вопросах ценообразования.

## Проблеми. Пошук. Рішення.

Епідемія туберкульозу сьогодні є однією з найбільших загроз для населення України. Тому інформація про досвід інших країн і міжнародних організацій у боротьбі з туберкульозом, у тому числі з питань використання протитуберкульозних лікарських засобів, їх розробки, виробництва, якості та реєстрації є дуже корисною для лікарів, провізорів, виробників ліків та співробітників регуляторних органів.

У зв'язку з цим ми публікуємо з незначними скороченнями переклад звіту неформальної наради ВООЗ по Комбінованим таблеткам для лікування туберкульозу, яка проходила 27 квітня 1999 року, а також коментар експерта ВООЗ в Україні Сура С.В., якому цей звіт був направлений для відгуку. Текст цього документа на англійській мові, як і інших документів ВООЗ із проблеми туберкульозу, можна знайти в Інтернеті за адресою <http://www.who.int/gtb/publications/fdc/index.htm>.

УДК 615.281.9(061/069)

WHO/CDS/CPC/TB/99.267

### Комбіновані таблетки з фіксованим дозуванням для лікування туберкульозу

Звіт неформальної наради, яка проходила в Женеві 27 квітня 1999 року

Всесвітня організація охорони здоров'я, Кластер захворювань, що передаються

#### СТИСЛЕ РЕЗЮМЕ

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) постійно підкреслює, що боротьба з глобальною небезпекою туберкульозу, як це пропонує стратегія DOTS (Directly observed treatment strategy — стратегія, яка передбачає застосування ліків пацієнтом під наглядом лікаря або спеціально підготовленого фахівця), потребує оптимального функціонування всіх елементів у рамках контролю за туберкульозом. Суттєвим компонентом стратегії DOTS є надійна поставка якісних ліків. Туберкульоз потребує лікування за допомогою від трьох до п'яти ліків одночасно, залежно від категорії пацієнтів. Ці протитуберкульозні ліки можуть бути у вигляді препаратів із однією активною речовиною або у вигляді комбінованих препаратів із фіксованим дозуванням (FDC), в яких двоє, або більше ліків знаходяться у фіксованих співвідношеннях в одному препараті. ВООЗ та Міжнародна спілка боротьби з туберкульозом та хворобами легень (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease - IUATLD) закликають замінювати препарати з однією активною речовиною FDC-таблетками для первинного лікування туберкульозу. Обґрунтування цих рекомендацій викладено нижче.

#### Обґрунтування застосування FDC-таблеток

##### **Який підхід рекомендований для лікування туберкульозу ?**

- Рифампіцин (R), Ізоніазид (H), Піразинамід (Z), та Етамбутол (E) щоденно протягом 2-3 міс.
- R та H протягом наступних 4 міс щоденно або 3 рази на тиждень, або E та H щоденно протягом 6 міс.
- Бажано використовувати FDC-таблетки.
- FDC-таблетки з 2 та 3 компонентами вже широкого використовуються, 4-компонентні та педіатричні FDC-таблетки впроваджуються.

##### **Чому комбіновані таблетки з фіксованим дозуванням ?**

- Це забезпечує простий підхід до доставки правильної кількості ліків у правильних дозах, бо всі необхідні ліки комбінуються в одній таблетці.
- На противагу варіюванню кількості таблеток відповідно до маси тіла пацієнта, повне лікування надається без необхідності розрахунку дози.

##### **Які переваги FDC-таблеток ?**

- Запобігання монотерапії; відповідно зменшується ризик розвитку бактерій, резистентних до ліків. Якщо FDC-таблетки застосову-

ють без нагляду фахівців, це не захищає пацієнтів від неодноразового переривання лікування. Багаторазове переривання лікування може посилювати небезпеку резистентності до ліків [1]. Отже, FDC-таблетки мають прийматися під безпосереднім наглядом фахівця, як мінімум під час інтенсивної фази лікування.

- Спрощується виписування та призначення; покращується виконання режиму лікарем та пацієнтом.

- Полегшується робота при зберіганні, перевезенні та реалізації ліків. Зменшується ризик неправильного використання рифампіцину, призначеного для лікування туберкульозу, для лікування інших захворювань.

**Чи є ціна FDC-таблеток більшою, ніж ціна однокомпонентних препаратів?**

- Ціна двокомпонентних FDC-таблеток вже однакова з вартістю суми однокомпонентних препаратів. Таке ж зменшення коштів очікується для 4-компонентних FDC-таблеток.

- Високий реєстраційний збір та/або податки на імпорт, що збираються у багатьох країнах, є темою для обговорення. Якщо такі витрати значно впливають на вартість ліків, то мають бути розглянуті питання щодо зменшення або відміни таких зборів на протитуберкульозні FDC-таблетки.

Дво- та трикомпонентні FDC-таблетки успішно використовують у всьому світі з кінця 1980 років, вони зареєстровані більше, ніж у 40 країнах. Приблизно в четвертій частині випадків туберкульозу у світі використовували лікування FDC-таблетками, що містили рифампіцин [2]. Однак, велика кількість наявних FDC-таблеток із різним вмістом активних речовин викликає плутанину та можливість помилкового дозування. Тому дво- та трикомпонентні FDC-таблетки, що містять зазначені дози, були внесені в 1997 році до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ (див. нижче) [3].

У 1998 році ВООЗ та IUATLD узгодили рекомендовані вмісти для чотирикомпонентних FDC-таблеток для щоденного використання та для трьох педіатричних препаратів. Цей переглянутий перелік був запропонований для включення до редакції Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ 1999 року (див. нижче). «Хьост Меріон Русель» (Південна Африка) нещодавно підготував для реєстрації чотирикомпонентні FDC-таблетки, а «Новартіс» (Південна Африка) зареєстрував два педіатричних FDC-препарати відпо-

відно до нових рекомендацій ВООЗ/IUATLD щодо дозування. Відомо, що інші компанії також розробляють препарати відповідно цих рекомендацій. 4-компонентні FDC-таблетки, які хоч і відрізняються від рекомендованих ВООЗ дозувань, вже використовують у таких країнах, як Індія, Пакистан та Південна Африка. Відомо, що такі 4-компонентні FDC-таблетки виробляють «Люпін Лебораторієз Лтд.» (Індія), «Ваєс-Ледерле» (Пакистан) та «Хьост Меріон Русель» (Південна Африка).

Необхідність стандартизації

- В національних програмах мають використовуватися виключно тільки FDC-таблетки з рекомендованими дозуваннями.

- FDC-таблетки, рекомендовані в Модельному переліку життєво необхідних ліків ВООЗ, редакція 1997 року:

RHZ (таблетки): 150 мг + 75 мг + 400 мг (для щоденного застосування)  
 150 мг + 150 мг + 500 мг (для проміжного застосування 3 рази на тиждень)  
 RH (таблетки): 150 мг + 75 мг (для щоденного застосування)  
 300 мг + 150 мг (для щоденного застосування)  
 HE (таблетки): 150 мг + 400 мг (для щоденного застосування)

- FDC-таблетки, запропоновані для включення до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ в 1999 році:

RHZE (таблетки): 150 мг + 75 мг + 400 мг + 275 мг (для щоденного застосування)  
 RHZ (таблетки): 60 мг + 35 мг + 150 мг (для педіатричного застосування (щоденно))  
 RH (таблетки): 60 мг + 35 мг (для педіатричного застосування (щоденно))  
 60 мг + 60 мг (для педіатричного застосування (проміжне застосування 3 рази на тиждень))

Перехід від однокомпонентних препаратів до FDC-таблеток триває багато років і впровадження 4-компонентних FDC-таблеток є тільки одним із подальших кроків для забезпечення адекватного лікування туберкульозу. Однак при цьому необхідно брати до уваги обставини, що стосуються забезпечення якості FDC-таблеток, їх реєстрації та пере-

шкод для їх ефективного використання в національних програмах. У зв'язку з цим була проведена спільна нарада представників ВООЗ, фармацевтичної промисловості, університетів та національних органів із реєстрації для видачі рекомендацій із цих питань. Головним питанням якості FDC-таблеток є забезпечення біодоступності рифампіцину. Відомо, що коли рифампіцин комбінується з іншими активними речовинами в одному препараті, його біодоступність може погіршуватися, якщо виробничі процедури суворо не контролюються. Таким чином, значна кількість FDC-таблеток, яка сьогодні представлена на ринку, може бути субстандартною, якщо брати до уваги питання біодоступності рифампіцину. Для дослідження цієї проблеми були вибрані референс-лабораторії та був розроблений спрощений протокол випробувань біодоступності/еквівалентності за помірними коштами. В двох референс-лабораторіях, сертифікованих ВООЗ, був випробуваний ряд дво-, три- та чотирикомпонентних препаратів, які були визнані такими, що відповідали рекомендованим специфікаціям.

#### Якість FDC-таблеток

- Біодоступність FDC-таблеток визначається кількістю лікарської речовини, яка переходить до крові. Якщо біодоступність неадекватна, пацієнт може недоодержати лікарську речовину при лікуванні. Вироблені відповідно до вимог GMP FDC-таблетки були біоеквівалентними препаратам з одним активним компонентом, у тому числі з рифампіцином.
- Задовільне проходження тесту на розчинення не гарантує адекватної біодоступності. Недавні дослідження показали, що на ринку знаходиться багато FDC-препаратів із низькою біодоступністю рифампіцину.
- ВООЗ має здійснити проект із розробки рекомендацій для промисловості та споживачів за критеріями належної якості FDC-таблеток, та як ця якість може бути відстежена на національному рівні.

Як зазначалося вище, представники промисловості, які брали участь у нараді, повідомили про прогрес у виробництві FDC-таблеток, реєстрацію та перереєстрацію цих препаратів. Однак виробники висловили занепокоєння у зв'язку із затримкою внесення до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ дозувань, узгоджених

ВООЗ/IUATLD, різними реєстраційними вимогами в різних країнах та інколи високими реєстраційними зборами. Також було відмічено, що деякі національні регуляторні органи не мають достатнього професійного рівня для виконання своїх обов'язків. Багато національних регуляторних органів в країнах, що розвиваються, прагнуть реєструвати лікарські препарати, які вже зареєстровані в Європі або США. У зв'язку з цим було згадано, що європейські регуляторні органи вимагають проведення клінічних випробувань ефективності для комбінованих препаратів, які містять більше, ніж дві активні речовини. Чотирикомпонентні FDC-таблетки містять генеричні лікарські речовини, ефективність та безпечність яких була доведена і дія яких була добре досліджена як для індивідуальних препаратів, так і для застосованих разом. Витрачені час і кошти для проведення додаткових клінічних досліджень можуть бути для виробників значним гальмом у виробництві FDC-таблеток.

#### Регуляторні питання

- Біодоступність рифампіцину має бути вимогою для реєстрації.
- ВООЗ завершає підготовку спрощеного протоколу для випробування біодоступності рифампіцину та інших реєстраційних вимог, який буде включати перелік лабораторій, які входять до мережі для забезпечення якості FDC-таблеток.
- Має бути посилений професійний рівень національних регуляторних органів для роботи з реєстрації FDC-таблеток.
- Стосовно зауважень виробників до процесу реєстрації щодо парадоксу, що регуляторні органи вимагають, щоб чотирикомпонентні FDC-таблетки були внесені до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ перед реєстрацією. Однак комітет ВООЗ із Модельного переліку життєво необхідних ліків ставить вимогу, щоб таблетки вже були доступні та зареєстровані, як мінімум, в одній країні перед тим, як бути внесеними до переліку.
- Має бути підготовлений і бути доступним для виробників та фахівців із туберкульозу мастер-файл із затвердженими вимогами для FDC-таблеток, які пропонуються для заміни однокомпонентних препаратів.

Впровадження до національних програм

Зміна політики використання однокомпонентних препаратів на застосування FDC-таблеток вимагатиме відповідного планування та поширення інформації для лікарів, відділів забезпечення та місцевих регуляторних органів. У зв'язку з цим слід пам'ятати такі моменти:

- Має бути підготовлений персонал.
- Мають бути переглянуті настанови та навчальні матеріали.
- Плани забезпечення ліками мають бути відповідними до програм з боротьби з туберкульозом.
- Має бути адаптована політика зі зберігання та дистрибуції.
- Мають бути створені механізми альтернативного лікування пацієнтів із небажаними реакціями на окремі ліки.
- Має бути скоректована система документування та звітів.
- Буде потрібен значний час для перехідного періоду.

Головні рекомендації наради

- ВООЗ слід рекомендувати країнам-членам використовувати для лікування туберкульозу FDC-таблетки замість однокомпонентних препаратів.
- Дозування, рекомендовані ВООЗ/IUATLD, слід запропонувати для включення до редакції 1999 року Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ.
- Біоеквівалентність рифампіцину в FDC-таблетках має перевірятися відповідно до стандартного протоколу, розробленого ВООЗ та IUATLD.
- Може бути потрібним навчання персоналу регуляторних органів із питань реєстрації FDC-таблеток, ВООЗ слід стати координатором цього проекту.
- Для зведення до мінімуму затримки реєстрації FDC-таблеток рекомендується використовувати прискорену процедуру (fast-track process).
- Для більшої доступності на ринку FDC-таблеток пропонується відмінити або зменшити для них реєстраційні збори та податки на імпорт.
- Рекомендується використовувати систему попередньої кваліфікації постачальників FDC-таблеток UNICEF або іншими агентствами, як це робиться для вакцин. Багато, щоб виробники внесли пропозиції щодо критеріїв для такої схеми попередньої кваліфікації.

- Впровадження переходу від однокомпонентних препаратів до FDC-таблеток вимагатиме значних змін у системі забезпечення ліками багатьох країн, національних програмах із боротьби з туберкульозом та національних програмах із життєво необхідних ліків.

Нарада знов підкреслила важливість використання FDC-таблеток як компонента стратегії DOTS проти глобальної небезпеки туберкульозу. Учасники наради підтвердили необхідність партнерського підходу, який був використаний на нараді.

ОБГРУНТУВАННЯ

ВООЗ, IUATLD та партнери рекомендують використання комбінованих таблеток із фіксованим дозуванням (FDC) для лікування туберкульозу (ТБ) [4-6]. Ідея використання FDC-таблеток випливає з факту, що туберкульоз завжди потребує лікування кількома препаратами. Для кожного із протитуберкульозних препаратів є добре визначені рекомендовані дози на масу тіла пацієнта. Відповідно до інтервалів між мінімальною та максимальною дозами, мали б бути визначені інтервали маси тіла, при яких можна було б застосовувати необхідну кількість FDC-таблеток. Таблетки мали б бути зроблені таким чином, щоб містити правильні кількості всіх необхідних лікарських засобів в одному препараті і мати однаковий розмір і колір для спрощення процесу призначення. Це також означає, що в порівнянні з однокомпонентними препаратами для отримання однакової кількості ліків була б потрібна менша кількість таблеток.

Обґрунтування рекомендацій для заміни однокомпонентних таблеток FDC-таблетками при первинному лікуванні туберкульозу включає такі моменти:

- FDC-таблетки запобігають монотерапії, очікується, що це зменшить небезпеку туберкульозу, резистентного до ліків.
- FDC-таблетки спрощують лікування і, таким чином, зменшують помилки при виписуванні ліків та збільшують взаєморозуміння між лікарем та пацієнтом.
- FDC-таблетки спрощують управління постачанням ліків, їх транспортування та дистрибуцію.
- FDC-таблетки зменшують ризик неправильного використання рифампіцину для лікування інших захворювань.

### Запобігання резистентності до ліків

Небезпека резистентності до ліків на території із високим рівнем захворюваності є значною загрозою подальшому успіху контролю за туберкульозом. Резистентність до ліків для більшості хворих на туберкульоз особливо зростає внаслідок багаторазового переривання лікування [1,7]. При використанні однокомпонентних препаратів пацієнти більш схильні до переривання свого лікування, замінюючи деякі ліки, що відсутні, на інші, і, таким чином, збільшуючи ризик монотерапії та селекції резистентних до ліків штамів. Крім того, ситуації, пов'язані з відсутністю ліків у наявному асортименті або із закінченням терміну придатності, можуть призводити до того, що деякі ліки продовжують залишатися в ізоляції в той час, коли нові запаси інших ліків лише очікуються, що є іншим потенційним джерелом монотерапії. Запобігти подібним проблемам набагато легше, якщо використовувати FDC-таблетки.

Неадекватна доза, особливо рифампіцину, також може призводити до неефективності лікування та появи резистентності до ліків. FDC-таблетки належної якості забезпечують доставку точної дози і, якщо вони застосовуються під наглядом фахівця, як це рекомендує стратегія DOTS, можуть допомогти в запобіганні резистентності до протитуберкульозних ліків [8]. Якщо FDC-таблетки застосовуються без нагляду, пацієнти можуть неодноразово переривати лікування, що може призводити до появи небезпеки резистентності до ліків [1]. Таким чином, FDC-таблетки мають застосовуватися під наглядом фахівця, щонайменше протягом інтенсивної фази, для запобігання появи резистентності. Якщо біодоступність рифампіцину недостатня, як це може бути у випадку субстандартних FDC-таблеток, наслідком може стати неспроможність лікування та поява небезпеки резистентності туберкульозу до ліків. Таким чином, гарантування біодоступності рифампіцину є абсолютною вимогою для виробництва FDC-таблеток. Регуляторні установи мають бути рішуче підтримані в наполегливому вимаганні закупівлі та дистрибуції продукції, для якої можуть бути продемонстровані дані з біодоступності.

### Спрощення лікування

Незважаючи на недостатню кількість безпосередньої інформації, яка підтримує погляд, що використання FDC-таблеток у лікуванні туберкульозу збільшує скарги пацієнта

на лікування, дослідження, проведене у Гонконгу [9], показало, що тільки 1 % із 312 пацієнтів, що приймали FDC-таблетки, виявив невдоволення щодо їх розміру, кількості таблеток, яку ковтають, та пов'язаних із цим труднощів, у порівнянні з 5 % із 308 пацієнтів, які приймали однокомпонентні препарати. Скарги на побічні ефекти були подібні в обох групах. Менша кількість таблеток на день для ковтання, безперечно, зробить лікування легшим (Табл. 1). Взагалі, FDC-таблетки запобігають нерозбірливому вибору ліків та, таким чином, зменшують кількість помилок при розрахунку дозувань [10]. Комбіновані препарати мають бути особливо корисними для використання в секторі приватної медицини, де національні настанови можуть бути недостатньо доступними, і де може бути більш загальним використання неадекватних лікувальних режимів [11].

Таблиця 1

**Кількість таблеток, які щоденно приймає пацієнт із масою тіла 50 кг в інтенсивній фазі лікування туберкульозу у вигляді однокомпонентних або комбінованих препаратів із фіксованим дозуванням**

Однокомпонентні таблетки	Кількість таблеток	FDC-таблетки	Кількість таблеток
Рифампіцин (R) 150 мг	3	RHZE	3
Ізоніазид (H) 300 мг	1 (3)	(150 мг +	
Піразинамід (Z) 400 мг	3	75 мг +	
Етамбутол (E) 400 мг (100 мг)	2 (7)	400 мг + 275 мг)	
Загальна кількість	9 (16)	Загальна кількість	3

\* Позначення в дужках відносяться до альтернативного дозування та відповідної кількості таблеток

### Спрощення управління постачанням ліків

FDC-таблетки спрощують управління постачанням ліків. Для однокомпонентних препаратів ситуації, пов'язані з відсутністю ліків у наявному асортименті, виникають із трьох основних причин: відсутності резервного запасу, затримки в отриманні заявок на поставки та закінчення терміну зберігання ліків. При використанні FDC-таблеток існує менша кількість препаратів, які треба враховувати, що робить легшим розрахунок потреби в ліках. Оскільки замовляється, перевозиться та розподіляється менша кількість препаратів, це призводить до зменшення штату службовців, зайнятих у національних протитуберкульозних програмах. Однак, у разі використання FDC-таблеток, питання щодо побічних ефектів ускладнює менеджмент лікарської терапії. Головним побічним ефектом



при лікуванні туберкульозу є гепатит, який можуть спричинити всі протитуберкульозні ліки (можливо, за винятком стрептоміцину). Однак, при застосуванні нещодавно рекомендованих дозувань у режимі короткого курсу, гепатит був виявлений тільки у 3 і менше відсотків пацієнтів [12]. Крім того, повідомлялося про те, що поява побічних ефектів при використанні FDC-таблеток є не більш частим явищем, ніж при використанні комбінації однокомпонентних препаратів [9, 13]. Все ж таки у випадках підозри, що серйозний побічний ефект або непереносимість викликані одним або кількома компонентами FDC-таблеток, буде виникати потреба в однокомпонентних препаратах. Має бути знайдено відповідне практичне рішення цієї проблеми. Хоча рекомендовано замінювати однокомпонентні таблетки FDC-таблетками, слід мати в розпорядженні невеликий запас однокомпонентних препаратів. Цей запас має зберігатися тільки в медичних установах, які мають оснащення високого рівня та компетентних спеціалістів для лікування туберкульозу у пацієнтів, у яких виявлено побічні ефекти.

#### FDC-таблетки мінімізують ризик крадіжки та неправильного використання рифампіцину для лікування інших захворювань

Окрім туберкульозу, рифампіцином можуть успішно лікуватися деякі інші загальні інфекційні захворювання. Отже, крадіжки та продаж цього препарату на чорному ринку не є незвичними явищами. Використання рифампіцину для інших цілей, ніж лікування туберкульозу, може призводити до монотерапії рифампіцином хворих на супутній туберкульоз. Монотерапія рифампіцином хворих на туберкульоз скоріше призводить до резистентності до рифампіцину, ніж у тих випадках, коли він призначається тільки на короткий період. В комбінованих ліках присутність ізоніазиду зменшує вірогідність виживання штамів, резистентних до рифампіцину. FDC-таблетки значно менш привабливі для продажу на чорному ринку тому, що містять також інші активні речовини, які відрізняються від рифампіцину. Таким чином, використання FDC-таблеток допомагає мінімізувати ризик крадіжки та неправильного використання рифампіцину для лікування інших захворювань.

#### *Рекомендований вміст активних речовин в FDC-таблетках*

Існують у деякій мірі суперечливі вказівки щодо рекомендованого вмісту кожної активної речовини в FDC-таблетках. На сьогоднішній день на ринку присутня велика кількість різноманітних FDC-таблеток різного складу, і багато з них відрізняються за вмістом активних речовин від тих, що рекомендовані ВООЗ. У таких умовах призначення FDC-таблеток може бути більш складним, ніж призначення однокомпонентних препаратів. Для раціонального використання FDC-таблеток, таблетки з рекомендованим вмістом активних речовин мають бути широко доступні. Поки що тільки 2- та 3-компонентні FDC-таблетки наведені в Модельному переліку життєво необхідних ліків ВООЗ, хоча було запропоновано включити 4-компонентні FDC-таблетки до редакції Переліку в 1999 році [3]. Інформаційні матеріали, які підготовлені Фармакопеею США, включають монографію на 3-компонентні FDC-таблетки, вміст активних речовин в яких відповідає рекомендованому ВООЗ, хоча самі таблетки відсутні на ринку США [15]. Консультативний комітет із технічних досліджень (The Technical Research and Advisory Committee - TRAC) у серпні 1998 року у ВООЗ, Женева, рекомендував додати до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ 4-компонентні FDC-таблетки для дорослих, а також три види педіатричних FDC-таблеток (Табл. 4) [16]. Ці рекомендації базуються на режимі дозувань, запропонованому ВООЗ (Табл. 2), для якого доза на таблетку визначається у припустимих межах, виходячи з контрольної точки, що дорівнює 55 кг, вище та нижче якої потрібно 3 або 4 таблетки для доставки правильної дози для пацієнта.

#### Якість FDC-таблеток

Основним моментом у використанні FDC-таблеток є забезпечення використання лише FDC-таблеток належної якості. На симпозиумі з контролю якості протитуберкульозних ліків, який був частиною наукової наради IUATLD, в Дубровніку, у жовтні 1988 року д-р Ацоцелла (Університет Павії, Італія) представив результати дослідження біодоступності рифампіцину в 2- та 3-компонентних FDC-таблетках. Його дослідження показали, що біодоступність рифампіцину в FDC-таблетках, особливо в 3-компонентних, може бути недостатньою. Крім того, очевидно задовільні результати тесту на розчинення *in vitro* не га-

рантують достатньої біодоступності рифампіцину [17]. Результати серії досліджень показали, що в той час, коли деякі FDC-препарати мають прийнятну біодоступність рифампіцину, інші FDC-препарати її не мають [17-26]. Із цього витікає, що біодоступність рифампіцину легко ставиться під загрозу, якщо суворо не дотримуються процедури виробництва або використовуються вихідні речовини низької якості. Прийом FDC-таблеток із недостатньою біодоступністю рифампіцину означає надання неадекватної терапії. Отже, використання FDC-таблеток із недостатньою біодоступністю рифампіцину може безпосередньо призводити до незадовільних результатів лікування та викликати резистентність до ліків, а не перешкоджати їй. Належна якість FDC-таблеток із продемонстрованою біодоступністю рифампіцину є абсолютною вимогою для успішних результатів лікування в програмах, які використовують режим застосування FDC-таблеток. Базуючись на цьому обґрунтуванні, у 1994 році ВООЗ та IUATLD видали спільну заяву, яка повідомляла, що при лікуванні туберкульозу мають використовуватися тільки FDC-таблетки належної якості з підтвердженою біодоступністю рифампіцину [4]. Існує декілька відкритих статей у спеціальному додатку до Міжнародного журналу туберкульозу та хвороб легенів (*International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*), які присвячені забезпеченню якості FDC-таблеток. Вони включають огляд фармакології рифампіцину [32], та спрощений протокол для оцінки біодоступності рифампіцину і його використання в дослідженнях, які проводилися в Південній Африці та Індії [27-29] із використанням методів вискоелективної рідинної хроматографії для кількісного визначення рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду [30] та з метою професійної перевірки лабораторій по дослідженню біодоступності рифампіцину [31].

#### Реєстрація FDC-таблеток

На міжнародному ринку присутня фармацевтична продукція як належної, так і низької якості. Реєстраційний процес та установи, які відповідають за реєстрацію ліків, є основними елементами, які забезпечують використання в будь-якій країні тільки ліків належної якості. Реєстрація фармацевтичних продуктів має гарантувати не тільки те, що продукт сам по собі належної якості, але також і те, що виробник суворо дотримується визнаної належної виробничої практики

(GMP) і належного контролю якості на місці. Тільки у такий спосіб можливо гарантувати надійні поставки та доступність якісних FDC-таблеток. ВООЗ та партнери працюють над розвитком та посиленням механізмів прискорення реєстрації FDC-таблеток. Деякі найближчі статті в Міжнародному журналі з туберкульозу та хвороб легенів будуть обговорювати реєстраційні вимоги [33] та тендерні заяви [34] для протитуберкульозних FDC-таблеток. В інших публікаціях стратегії ВООЗ щодо забезпечення якості вакцин були переглянуті з тим, щоб отримати вихідні дані для розробки подібних стратегій для FDC-таблеток [35]. Інші статті, як очікується, будуть присвячені питанням політичних рекомендацій, таким як роль і відповідальність при використанні FDC-таблеток у програмах контролю туберкульозу [36], відповідальність та необхідні структури для створення мережі лабораторій для оцінки якості FDC-таблеток [37].

#### Ринок FDC-таблеток

Через 11 років після повідомлення д-ра Акоцелла в Дубровніку для лікування туберкульозу все частіше використовують FDC-таблетки. За оцінкою ВООЗ світового ринку FDC-таблеток в 1998 році близько 50 % країн використовували FDC-таблетки [2]. У той час, коли невеликі країни частіше використовують FDC-таблетки, країни з численним населенням та територіями з високим рівнем захворюваності схильні використовувати однокомпонентні таблетки. Однак, д-р Каталані показав, що у вигляді FDC-таблеток, які поширені в Індії, використовується 62 % рифампіцину, який застосовують у секторі приватної медицини. Згідно огляду ВООЗ 1998 року, близько 24 % випадків туберкульозу в усьому світі лікуються FDC-таблетками, до складу яких входить рифампіцин. Однак, більшість пацієнтів приймають тільки 2-компонентні препарати. На сьогодні менше, ніж у 5 % випадків пацієнти отримували 3- або 4-компонентні FDC-таблетки. У 75 % випадків туберкульоз все ще лікується виключно однокомпонентними препаратами, тому до цього часу головною метою залишається заміна однокомпонентних таблеток FDC-таблетками при первинному лікуванні туберкульозу.

#### Всесвітня доступність ліків

Ініціатива "Зупинити туберкульоз" (Stop TB Initiative), проголошена генеральним директором ВООЗ, визнає проблему доступ-

ності протитуберкульозних ліків високої якості як одну з найслабших ланок у ланцюзі стратегічних елементів контролю епідемії туберкульозу. Проголосивши відповідне занепокоєння, Ініціатива «Зупинити туберкульоз» пропонує концепцію «Всесвітня доступність ліків» (Global Drug Facility), яка ставить за мету визначити обов'язкові вимоги та запропонувати рішення для сприяння доступності протитуберкульозних ліків високої якості в усьому світі. Основним компонентом цієї концепції буде проголошення закликів замінити FDC-таблетками однокомпонентні таблетки в програмах з контролю туберкульозу та в переліках життєво необхідних ліків в усіх країнах [39].

#### Використання FDC-таблеток як частини стратегії DOTS

Було висловлене положення, що FDC-таблетки могли б сприяти та заохочувати самонагляд у лікуванні туберкульозу, підтримуючи таким чином рекомендовану ВООЗ стратегію DOTS для контролю туберкульозу. Безперечно, ВООЗ не поділяє такий погляд. FDC-таблетки не виключають потреби в нагляді за лікуванням, хоча вони можуть спростити цей процес. Крім того, як і раніше, залишаються важливими інші компоненти стратегії DOTS, такі як державні зобов'язання, виявлення випадків захворювання методом мікроскопії мазків мокроти, система моніторингу для оцінки та нагляду. ВООЗ рекомендує використання FDC-таблеток як нового інструмента, який проголошується складовою частиною стратегії DOTS.

#### Мета наради 27 квітня 1999 року

- Обмін ідеями між представниками фармацевтичної промисловості, ВООЗ та іншими організаціями, які мають відношення до впровадження FDC-таблеток, особливо 4-х компонентних FDC-препаратів, як замінників однокомпонентних ліків при первинному лікуванні туберкульозу.
- Визначити основні перешкоди в процесі впровадження 4-компонентних FDC-таблеток для лікування туберкульозу.
- Запропонувати рекомендації та наступні кроки, які потрібно зробити для усунення визначених перешкод.

#### ВІДКРИТТЯ НАРАДИ

Нараду відкрив д-р Девід Хейман, виконавчий директор Кластеру хвороб, що передаються. Він стисло розповів про небезпеку туберкульозу як глобальної проблеми охоро-

ни здоров'я та припустив, що FDC-таблетки могли б зіграти вирішальну роль в ефективній боротьбі з цією серйозною хворобою. Д-р Пол Нанн привітав присутніх від імені Ініціативи «Зупинити туберкульоз» та ознайомив із концепцією «Всесвітня доступність ліків». Остаточна форма концепції поки ще не прийнята, але дуже ймовірно, що основною складовою концепції буде використання FDC-таблеток.

#### Мета наради

Д-р Серджіо Спінаці ознайомив присутніх із метою наради. Він запропонував, щоб нарада розглянула ситуацію в світі щодо забезпечення FDC-таблетками, визначила перешкоди широкому впровадженню FDC-таблеток, сприяла обміну ідеями між представниками фармацевтичної промисловості, ВООЗ та іншими організаціями та запропонувала заходи для усунення цих перешкод. Він зробив огляд багатьох причин, що підтверджують необхідність **заміни** однокомпонентних препаратів FDC-таблетками. На прикладі минулого досвіду з 2-компонентними FDC-таблетками він припустив, що з часом ціна FDC-таблеток може стати такою ж самою, як для однокомпонентних таблеток. Крім того, прибуток від покращення лікування, зменшення вартості перевезень, зменшення збитків та запобігання утворення полірезистентних штамів туберкульозу, зробили би заміну FDC-таблетками вигідною у фінансовому відношенні. Побічні ефекти при використанні FDC-таблеток НЕ є більш загальним явищем, ніж при використанні однокомпонентних препаратів [9,13]. ВООЗ та IUATLD домовилися щодо стандартних комбінацій та режиму дозувань у залежності від маси тіла пацієнта для чотирикомпонентних FDC-таблеток та 3 видів педіатричних FDC-таблеток [16]. Найбільшою перешкодою у використанні FDC-таблеток є питання щодо якості, особливо біодоступності рифампіцину в FDC-таблетках. Постачання субстандартних FDC-таблеток могло б призвести до неспроможності лікування та появи небезпеки резистентності до ліків. ВООЗ активно виступає з відповідними рекомендаціями щодо якості рифампіцину, і за минулі кілька років організація брала участь у таких заходах:

- Розробка протоколу для оцінки біодоступності рифампіцину в FDC-таблетках.
- Розробка протоколу для оцінки професійного рівня лабораторій, які хотіли б бути учасниками міжнародної мережі з визначен-

ня біодоступності рифампіцину в FDC-таблетках.

- Стандартизація вмісту активних компонентів в FDC-таблетках.
- Огляд стратегій із забезпечення якості та постачання вакцин, із метою впровадження цього досвіду для протитуберкульозних ліків.

#### Вміст активних речовин та дозування для FDC-таблеток, рекомендовані ВООЗ/IUATLD

Професор П'єр Шале зробив огляд ситуації, яка склалася у світі для FDC-таблеток щодо їх дозованих форм та схем лікування. Він звернув увагу на важливий факт, що використання FDC-таблеток не є новою концепцією контролю туберкульозу. В дійсності, FDC-таблетки існують та успішно використовуються для лікування туберкульозу протягом більше 20 років. Різними компаніями виробляється широкий асортимент препаратів, які зареєстровані і продаються в різних країнах. Рекомендовані дозування (мг/кг) для важливих протитуберкульозних ліків (Табл. 2) були опубліковані в Рекомендаціях ВООЗ із лікування туберкульозу в 1997 році [5]. Професор підкреслив, що комбіновані препарати мають використовуватися для кожного із трьох стандартних режимів, які рекомендовані ВООЗ та IUATLD. Згідно з цими рекомендаціями до редакцій Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ 1995 та 1997 років були включені дво- та трикомпонентні FDC-таблетки для лікування туберкульозу (Табл. 3) [3].

На основі детальних робіт, які були представлені на нараді д-ром Бернардом Фурі, запропоновані додаткові чотирикомпонентні

комбінації активних речовин для дорослих і дво- та трикомпонентні ліки для дітей (Табл. 4). Ці препарати могли б комбінуватися за спрощеною схемою дозування в залежності від маси тіла (Табл. 5, 6).

#### Обґрунтування дозованих форм та режимів дозувань

Д-р Бернард Фурі продемонстрував графічні дані для обґрунтування комбінацій активних речовин та режимів їх дозувань. Ефективне терапевтичне дозування в мг/кг для різних протитуберкульозних ліків є загально визнаним і наведено вище (Табл. 2). Для будь-яких ліків існують терапевтичні межі, в яких ліки ефективні та нетоксичні. Він представив діаграми, які демонструють, що протитуберкульозні ліки у вигляді FDC-таблеток спрощують схему згідно маси тіла, яка гарантує, що дози відповідають терапевтичним межах. Наведені дані показали, що для контрольної точки для зміни кількості таблеток із 3 на 4, яка складала 50 кг або 55 кг, терапевтична ефективність була збережена. Таким чином, для значної більшості дорослих кількість таблеток як для інтенсивної, так і для подальшої фази лікування має бути такою ж самою. Для пацієнтів із масою тіла нижче 50 кг або 55 кг (у залежності від рішення НТР для даного регіону) дозування має становити 3 таблетки, тоді як для пацієнтів із масою тіла понад 55 кг - 4 таблетки. Для дітей із масою тіла від 10 кг та вище доза має становити 1 саше гранул або таблетку, що диспергується, на 5 кг маси тіла. Для меншої ваги тіла дозування має бути зменшено наполовину та при прирощенні на 2.5 кг відповідно збільшується. Діаграми демонстрували співвідношення доза/маса тіла для дорослих, де перехід від

Таблиця 2

#### Рекомендовані дози (мг/кг) для життєво необхідних протитуберкульозних ліків

Протитуберкульозний препарат (скорочення)	Спосіб дії	Рекомендована доза (мг/кг)		
		На добу	Періодичність	
			Тричі на тиждень	Двічі на тиждень*
Ізоніазид (H)	бактерицидний	5 (4-6)	10 (8-12)	15 (13-17)
Рифампіцин (R)	бактерицидний	10 (8-12)	10 (8-12)	10 (8-12)
Піразинамід (P)	бактеріостатичний	25 (20-30)	35 (30-40)	50 (40-60)
Етамбутол (E)	бактерицидний	15 (15-20)	30 (25-35)	45 (40-50)
Стрептоміцин (S)	бактерицидний	15 (12-18)	15 (12-18)	15 (12-18)
Тіоацетазон (T)	бактеріостатичний	2.5	не використовується	

\* ВООЗ в цілому не рекомендує режим прийому двічі на тиждень. Якщо пацієнт, який приймає ліки в режимі двічі на тиждень, пропустить прийом таблеток, ця втрачена доза буде складати більшу частину загальної кількості лікувальних доз у порівнянні з дозою щоденного режиму або режиму прийому тричі на тиждень. Отже, такий режим призводить до більшого ризику неспроможності лікування.

Таблиця 3

**Модельний перелік життєво необхідних ліків ВООЗ на грудень 1997 року**

Препарат	Лікарська форма	Вміст активних речовин
Стрептоміцин	порошок для ін'єкцій	S 1 г (у вигляді сульфату) на флакон
Рифампіцин	капсули або таблетки	R 150 мг R 300 мг
Ізоніазид	таблетки	H 100 мг H 300 мг
Піразинамід	таблетки	Z 400 мг
Етамбутол	таблетки	E 100 мг E 400 мг
Тіоацетазон + ізоніазид	таблетки	T 50 мг + H 100 мг T 150 мг + H 300 мг
Ізоніазид + етамбутол	таблетки	H 150 мг + E 400 мг
Рифампіцин + ізоніазид	таблетки	R 150 мг + H 75 мг R 300 мг + H 150 мг R 150 мг + H 150 мг*
Рифампіцин + ізоніазид + піразинамід	таблетки	R 150 мг + H 75 мг + Z 400 мг R 150 мг + H 150 мг + Z 500 мг*

\* Для застосування тричі на тиждень

E=етамбутол, H=ізоніазид, R=рифампіцин, S=стрептоміцин, T=тіоацетазон, Z=піразинамід

Таблиця 4

**Рекомендований вміст активних речовин в FDC-таблетках, прийнятий нарадою Консультативного комітету ВООЗ у серпні 1998 року**

Препарат	Лікарська форма	Вміст активних речовин
Рифампіцин + ізоніазид (педіатричний)	таблетки**	R 60 мг + H 30 мг R 60 мг + H 60 мг*
Рифампіцин + ізоніазид + піразинамід (педіатричний)	таблетки	R 60 мг + H 30 мг + Z 150 мг
Рифампіцин + ізоніазид + піразинамід + етамбутол (для дорослих)	таблетки	R 150 мг + H 75 мг + Z 400 мг + E 275 мг

\* Для застосування тричі на тиждень

\*\* Перевага надається формам, які диспергуються

E=етамбутол, H=ізоніазид, R=рифампіцин, Z=піразинамід

Таблиця 5

**Режим дозувань для дорослих (кількість таблеток)**

Маса тіла пацієнта (кг)	Первинна фаза		Подальша фаза		
	2 міс		4 міс		6 міс
	RHZE щоденно	RHZ щоденно	RH щоденно	RH тричі на тиждень	EH щоденно
30-37*	2	2	2	2	1.5
38-54**	3	3	3	3	2
55-70**	4	4	4	4	3
71 та більше*	5	5	5	5	3

\* Тільки незначна частина дорослих хворих на туберкульоз підпадає до категорії з масою тіла від 30 кг до 37 кг або з масою тіла більше 70 кг. Виходячи з цього, на практиці, більшість пацієнтів, які приймають FDC-таблетки з рифампіцином, будуть вживати їх щоденно три або чотири рази.

\*\* В деяких країнах контрольна точка традиційно дорівнює 50 кг, а не 55 кг, як тут запропоновано. Перелік наведених дозувань також може розраховуватися, виходячи з контрольної точки, яка дорівнює 50 кг, тобто пацієнти з масою тіла від 35 кг до 49 кг приймають три таблетки, а пацієнти з масою тіла від 50 кг до 70 кг приймають 4 таблетки.

Таблиця 6  
Режим дозувань для дітей (кількість таблеток)

Маса тіла пацієнта (кг)	Початкова фаза		Подальша фаза	
	2 міс		4 міс	
	RHZ щоденно		RH щоденно	RH тричі на тиждень
До 7	1		1	1
8-9	1.5		1.5	1.5
10-14	2		2	2
15-19	3		3	3
20-24	4		4	4
25-29	5		5	5

3 до 4 таблеток відбувається в контрольній точці, яка дорівнює 55 кг. Існують подібні діаграми для дітей та для дорослих із контрольною точкою, що дорівнює 50 кг, для переходу з 3 на 4 таблетки.

#### Забезпечення якості FDC-таблеток

Д-р Гордон Еллард та д-р Бернард Фурі зробили спільну доповідь щодо аспектів якості FDC-таблеток. Вони відмітили, що різні комбінації активних речовин в FDC-таблетках, які досліджувалися протягом багатьох років, мали різні результати вивчення біодоступності рифампіцину; деякі з яких були задовільними, а деякі – ні [17-26]. Проблеми щодо біодоступності для ізоніазиду, піразинаміду та етамбутолу в FDC-таблетках не виникали вірогідно тому, що їх розчинність у воді значно більша. Як було визначено колориметричними методами, FDC-таблетки з незадовільною біодоступністю рифампіцину звичайно містили кількість рифампіцину, яка була близькою до номінального вмісту. Був зроблений висновок, що зменшення біодоступності рифампіцину може бути результатом зміни кристалічної форми рифампіцину, яка відбувається під час процесу таблетування [40]. Попередні дослідження показали залежність протитуберкульозної активності рифампіцину від дози [41]. Нещодавно при дослідженнях початкової активності рифампіцину було показано, що його терапевтичний індекс приблизно дорівнює тільки 4 у порівнянні з 16 для ізоніазиду [42]. Таким чином, його ефективність буде значно знижуватися при використанні препаратів зі зменшеним вивільненням рифампіцину. Із цієї причини потрібно встановлювати біоеквівалентність усіх FDC-таблеток, які містять рифампіцин [4, 23, 43, 44]. Цей процес поки що дорого коштує, але зараз створений спрощений та ефективний протокол проведення до-

сліджень, який відносно більш зручний та дешевий. Відповідно до цього протоколу використовують шість зразків крові, відібраних протягом восьми годин у певні проміжки часу, у той час, коли за стандартними вимогами потрібно близько тринадцяти зразків, відібраних протягом двадцяти чотирьох годин [28]. Було показано, що таке визначення біодоступності призводить до мінімальної втрати точності. На сьогоднішній день дві лабораторії визнані референс-центрами для визначення біодоступності рифампіцину в FDC-таблетках [31], до них із часом приєднуються інші лабораторії.

#### Реєстрація FDC-таблеток

Д-р Бернард Фурі доповів, що два 4-компонентні препарати вже зареєстровані в Південній Африці, хоча зараз вони мають вміст активних речовин, який відрізняється від рекомендованого ВООЗ (Табл. 7). Однак, вони відповідають вимогам, рекомендованим ВООЗ, щодо дозування в мг/кг. Нещодавно були зареєстровані два педіатричних препарати (2- та 3-компонентні FDC-таблетки), які також відповідають рекомендаціям ВООЗ. На реєстрацію були подані три препарати для дорослих (2- та 4-компонентні FDC-таблетки), які повністю відповідають рекомендованому ВООЗ дозуванню активних речовин на таблетку. Усі ці препарати пройшли тести з біодоступності рифампіцину та інших активних речовин. Загальною вимогою для реєстрації є проведення тестів із визначення біодоступності для всіх чотирьох компонентів FDC-таблеток, а не тільки для рифампіцину. Однак, згідно рекомендаціям ВООЗ, має бути встановлена тільки біодоступність рифампіцину, у той час коли для інших активних речовин достатньо представити результати тесту на розчинення.

Резюме

Д-р Бернанд Форі і д-р Гордон Еллард дійшли висновку, що:

- Мають використовуватися тільки ті препарати, що містять рифампіцин, для яких доведена його біодоступність.
- Вивчення біодоступності таких препаратів має проводитися в незалежних лабораторіях, сертифікованих ВООЗ, за допомогою попередньо валідованих методів ВЕРХ і згідно затвердженого, стандартизованого протоколу.
- Такі комбіновані препарати мають бути біоеквівалентні однокомпонентним еталонним препаратам рифампіцину, що доведено з використанням стандартних методів.

Мінімальні вимоги, які пропонуються для реєстрації FDC-таблеток

Мета плану, запропонованого д-ром Бернандом Форі - зменшити час і кошти, спростити реєстраційні вимоги, досягти стандартизації, гарантувати біодоступність рифампіци-

ну і продемонструвати відповідність якості. Це може бути досягнуто на рівні реєстрації, представлення тендерів і подальшого їх розміщення. Регуляторні органи багатьох країн, що розвиваються, сприяють реєстрації лікарських препаратів, які вже були зареєстровані в Європі або Сполучених Штатах. Отже, було висловлено занепокоєння тим, що регуляторні органи країн Європи вимагають клінічних випробувань щодо ефективності комбінованих лікарських засобів, які містять більше двох діючих речовин. Чотирикомпонентні FDC-таблетки містять генеричні лікарські речовини, ефективність і безпеку яких була доведена і дія яких була ретельно досліджена як для індивідуальних препаратів, так і для застосованих разом. Витрачені час і кошти для проведення додаткових клінічних випробувань можуть бути для виробників значним гальмом у виробництві FDC-таблеток [33]. Іншим критерієм для реєстрації було запропоновано доведення біодо-

Таблиця 7

**Препарати, які нещодавно пройшли випробування для реєстрації в Південній Африці і показали повну біодоступність/еквівалентність\***

*Референсний центр хіміотерапії мікобактерійних хвороб, Національна програма туберкульозних досліджень, Рада медичних досліджень, Південна Африка (РБ Форі, 1999)*

Препарат	Форма	Вікова група	Виробник	Статус у Південній Африці
**R120 + H60 + Z300 + E225	таблетки	дорослі	Ваес-Ледерле, Пакистан	зареєстрований
**R120 + H60 + Z300 + E200	таблетки	дорослі	Хьост Меріон Русель, П. Африка	зареєстрований
***R60 + H30 + Z150	швидко-розчинні таблетки	діти	Новартіс, П. Африка	зареєстрований
***R60 + H60	швидко-розчинні таблетки	діти	Новартіс, П. Африка	зареєстрований
***R150 + H75 + Z400 + E275	таблетки	дорослі	Хьост Меріон Русель, П. Африка	представлений до реєстрації
***R150 + H75	таблетки	дорослі	Хьост Меріон Русель, П. Африка	представлений до реєстрації
***R150 + H150	пакетики з гранулами	дорослі	Хьост Меріон Русель, П. Африка	представлений до реєстрації
***R60 + H30 + Z150	пакетики з гранулами	діти	Хьост Меріон Русель, П. Африка	представлений до реєстрації
***R60 + H30	пакетики з гранулами	діти	Хьост Меріон Русель, П. Африка	представлений до реєстрації

\* Біоеквівалентність: 90 % довірчого інтервалу співвідношення зразок/стандарт повністю знаходиться в межах 80 – 125 %.

\*\*Ці таблетки відповідають рекомендованим ВООЗ вимогам доза/маса тіла (мг/кг), але не відповідають рекомендованому ВООЗ дозуванню (Табл. 3 і 4).

\*\*\*Розроблені відповідно до рекомендованого ВООЗ дозування на таблетку (Табл. 3 і 4).

ступності рифампіцину за основними параметрами долі пікового рівня в сироватці ( $C_{max}$ ) і площі під кривою (AUC) для періоду часу від 0 год до 8 год із шестиразовим вимірюванням через певні проміжки часу. На цій стадії більшість країн вимагає випробування на біодоступність усіх діючих компонентів у таблетці.

Для представлення заяв для участі в тендерах від виробника слід запросити такі дані:

- Порівняльні результати вивчення біодоступності рифампіцину та дані випробувань із розчинення інших компонентів.
- Декларації від виробника про відповідність перших і наступних серій.
- Кореляцію результатів випробувань на розчинення різних серій протягом деякого часу.
- Заяву, що сировина відповідає вимогам специфікацій.

Після розміщення тендера для кожної серії, яка постачається, мають бути надані результати випробувань із розчинення, розпадання і хіміко-аналітичних випробувань. Після поставки може бути проведений звичайний скринінг лікарських засобів за допомогою колориметричних і фізичних методів та випробувань на розпадання. Клієнт повинен мати право вимагати проведення нових аналітичних випробувань продукції за рахунок постачальника. Усі процедури визначення якості продукту мають проводитися відповідно до протоколів ВООЗ в акредитованих лабораторіях.

#### Розширення використання FDC-таблеток

Самовпевненим було б вважати, що питання якості та реєстрації вже вирішені. Багато роботи все ще необхідно провести з постачання, контролю та розширення використання FDC-таблеток в Національних програмах із туберкульозу (НТР).

#### Перспективи Національних програм із туберкульозу

Д-р Якоб Кумарсен із Департаменту ВООЗ із профілактики і контролю інфекційних захворювань (СРС) стисло зобразив майбутнє розширення використання FDC-таблеток і зміни, які мають відбутися. На центральному рівні НТР мають оцінювати попит і відповідно регулювати план постачання. Питання зберігання і дистрибуції мають бути окреслені і вирішені (наприклад, вимоги до упаковки на центральному рівні в порівнянні з периферією). Для моніторингу і оцінки мають

бути створені системи післяпродажного нагляду і схеми забезпечення якості. Має проводитися широкомасштабне навчання працівників охорони здоров'я. Співробітники галузі на місцях повинні коректувати план замовлення препаратів, практичні методи обліку, гарантувати відповідність умов зберігання, розвивати план лікування хвороб і досліджувати обставини шкідливої дії лікарських засобів. Всі ці питання, звичайно, можна вирішити.

Проте, підготовча стадія тривалістю щонайменше 6-9 міс зробила б зміни більш легкими. Мають бути змінені національні правила; перепідготовлений персонал; відкоректована система реєстрації і звітування. У великих країнах може бути більш прийнятна поетапна реалізація впровадження таких змін.

#### Практичне впровадження і просування FDC-таблеток

Д-р Ганс Хогерзейль із Департаменту ВООЗ із життєво необхідних ліків та інших лікарських засобів (EDM) представив такий індикативний «контрольний перелік» необхідних кроків для широкого впровадження і використання FDC-таблеток у національних програмах. Цей перелік має розглядатися як рекомендації, а не обов'язкові вимоги. Кластер технологій охорони здоров'я і лікарських засобів ВООЗ (НТР) буде надалі працювати по визначенню проміжних кроків, які необхідно пройти до остаточного впровадження таких змін. Він підкреслив, що:

#### *Має бути належне наукове супроводження*

- Фармакологія, токсикологія, біодоступність.
- Чіткі рекомендації з лікування від комітету експертів, які базуються на клінічних доказах і даних аналізу ефективності витрат.
- Включення до міжнародних довідників і навчальних матеріалів.

#### *Має бути належний правовий/регуляторний статус*

- Включення до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ (листопад 1999 року).
- Реєстрація в країні виробництва, в країнах Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) і в країні використання.



#### *Має бути належний національний клінічний статус*

- Схвалення національними ТБ програмами і професійними асоціаціями.
- Схвалення національними терапевтичними комітетами і комітетами з лікарських засобів.
- Включення до національних рекомендацій зі стандартів лікування.
- Включення до національних переліків життєво необхідних ліків (на рівні фахівців).
- Включення до національних систем постачання або систем компенсації вартості ліків.

#### *Має бути належна система постачання*

- Достатня кількість постачальників (міжнародних, національних).
- Оцінка національних вимог, мінімальний рівень запасів, рівень для повторних замовлень.
- Фінансування, що є в наявності (державне, укладання позики, часткове, компенсація, приватне) та що визначене.
- Включення до основного каталога медичних запасів і тендерних документів.
- Система дистрибуції (вертикальна, інтегрована в державний сектор, (напів-) приватна).

#### *Має проводитися навчання і нагляд*

- Адоптація до національних рекомендацій із лікування.
- Включення до національних рецептурних довідників із лікування.
- Включення до національних навчальних програм і систем нагляду.
- Навчання в системах неперервної освіти (наприклад, неперервна медична освіта (СМЕ)) і професійних асоціаціях.

#### *Має існувати система нагляду*

- Післяпродажний нагляд за ефективністю та побічними діями FDC-таблеток.
- Протокол для оцінки впливу на кількість повторних захворювань і випадків розвитку резистентних форм туберкульозу.

#### Проблеми, які обговорювалися

За будь-яких змін існують перешкоди, які важко подолати. У цьому разі, локальні виробники можуть вважати, що важко відповідати критеріям попередньої кваліфікації. Така ситуація може бути суттєвою загрозою для успішного впровадження FDC-таблеток. Особлива увага має бути приділена формуванню системи, яка буде простою, недорогою і швидкою, щоб гарантувати, що критерії по-

передньої кваліфікації діють не як засіб залякування виробників, які виробляють проти-туберкульозні FDC-таблетки.

Перехід до чотирикомпонентних FDC-препаратів потребує відповідних гарантій уряду і інвестицій для забезпечення впевненості, що буде працювати система адекватного постачання цих лікарських засобів.

Офіційне повідомлення ВООЗ до Світового банку та інших великих замовників має чітко та однозначно викласти рекомендації ВООЗ із цього питання.

Чесна конкуренція може бути забезпечена, навіть за можливого зменшення числа виробників, запрошених до тендеру. До того ж, на противагу надання права на виконання всього замовлення одному виробникові, можна було б використовувати альтернативну систему, у якій найнижча запропонована ціна (виробником, що пройшов попередню кваліфікацію) виграє 50 % замовлення, наступна найнижча - 30 % і т.д.

Найбільшою проблемою якості FDC-таблеток є можлива неадекватна біодоступність рифампіцину при використанні його в комбінації з іншими компонентами. На жаль, така невідповідність може бути виявлена тільки шляхом дослідження біодоступності. Виробники, однак, підтримали систему суворого забезпечення якості FDC-таблеток, що містять рифампіцин.

#### **ДОПОВІДІ ПРЕДСТАВНИКІВ ПРОМИСЛОВОСТІ**

Представники деяких виробників стисло доповіли про свої проблеми при виробництві FDC-таблеток. Доповіді показали традицію виробництва різноманітних комбінацій FDC-таблеток відповідно до стандартів GMP протягом минулого десятиріччя. Зараз FDC-таблетки зареєстровані в багатьох країнах, і більшість таблеток містить дози, зазначені в Модельному переліку життєво необхідних ліків ВООЗ 1997 року. Д-р Гіоргіо Россігно - представник фармацевтичної компанії «Хьост Меріон Русель», доповів, що їх дво- і трикомпонентні FDC-таблетки вже зареєстровані в сорока країнах. Інші доповіді від фармацевтичних компаній представили д-р Георг Інграм - представник «Біохемі ГмбХ/Новартіс», д-р Ануп Банерджі - представник «Ліка Лабс Лімітед», пані Сузі Деммер - представник «Ваес-Ледерле» і д-р Річард Урбанчик - представник «Фетоль Арзнейміттель ГмбХ». На жаль, представники виробників із Індії та інших країн не змогли брати участь у цій на-

радї. Доповїдї засвїдчили, що виробники знаходяться на рїзних стадїях виробництва рекомендованих чотириккомпонентних FDC-таблеток: вїд маркетингового аналізу до реєстрації. Очікується, що цїна чотириккомпонентних FDC-таблеток не буде головною проблемою. Остаточна цїна пїсля вїдшкодування бїльш високих початкових витрат (обумовлена вартїстю обладнання тощо) має тенденцію наближення до вартостї лїкування однокомпонентними таблетками. Один з виробників, який не змїг вїдвїдати нараду, д-р Дхананья С. Бекхль - представник «Люпїн Лабс Лтд», повїдомив, що їх чотириккомпонентнї FDC-таблетки коштують менше за сумарну вартїсть окремих однокомпонентних таблеток. До того ж, передбачено використання системи знижок: цїна зменшується при збїльшеннї обсягу закупок.

#### Виробники висловили такї зауваження до процесу реєстрації

- В багатьох країнах здїйснюється реєстрація тїльки тих препаратів, якї внесенї до Модельного перелїку життєво необхідних лїків ВООЗ. Однак, для вклучення препарату до Модельного перелїку життєво необхідних лїків ВООЗ вимагає, щоб цей препарат був вже доступний і зареєстрований, щонайменше, в одній країнї. Цей явний парадокс перешкоджає швидкїй реєстрації чотириккомпонентних FDC-таблеток.
- Реєстраційнї вимоги вїдрїзняються в рїзних країнах. Деякї країнї не вимагають надавати результати дослїдження бїоеквивалентностї при реєстрації FDC-таблеток.
- Європейскї регуляторнї органи вимагають проводити клїнїчні випробування ефективностї для препаратів, якї мїстять комбїнації трьох або бїльше генеричних лїкарських речовин; регуляторнї органи багатьох неєвропейських країн вважають реєстрацію в Європї необхідною передреєстраційною умовою.
- Компетентнїсть нацїональних регуляторних органів є їнодї низькою, у той час як система сертифікації ВООЗ залежить вїд компетентностї персоналу органів з реєстрації.
- В деяких країнках запровадженї високї реєстраційнї збори, що є значною перешкодою для входження в ринок.

#### Були висловленї специфічнї зауваження

Д-р Урбанчїк - представник «Фетоль Арзнеймїттель GmbH» - висловив занепокоєння

тим, що їх маркетинговий аналіз показав вїдсутнїсть реального ринку для три- і чотириккомпонентних FDC-таблеток в Європї. Той факт, що в Європї вимагаються данї з клїнїчних випробувань для реєстрації комбїнованих лїкарських засобів, що мїстять бїльше двох активних компонентів, призвїв до наявностї на ринку тїльки двокомпонентних таблеток. Доки ця ситуація не змїниться, нїчого не можна буде зробити для просування чотириккомпонентних таблеток у цьому рїгонї.

В Росїї зареєстровано небагато FDC-таблеток, оскїльки влада не бажає їх реєструвати. Проте, зараз в Росїї встановлюється нова полїтика щодо реєстрації, і є можливїсть впливати на неї.

#### Спогївання промисловостї

- Глобальне узгодження Нацїональних програм з туберкульозу з рекомендацїями ВООЗ.
- Швидке внесення нових чотириккомпонентних FDC-таблеток до Модельного перелїку життєво необхідних лїків ВООЗ (1999 рїк).
- Бїльш активна роль ВООЗ й їнших мїжнародних органїзацій у сприяннї впровадженню стратегїї забезпечення якостї нацїональними регуляторними органами.
- Створення спецїальної комїсії ВООЗ і представників промисловостї для стандартизації реєстраційних вимог для FDC-таблеток.

#### Робочї групи

Учасники роздїлилися на двї робочї групи. Перша обговорювала проблеми реєстрації, друга – проблеми забезпечення якостї. Нижче представленї висновки, зробленї кожною групою.

#### Робоча група з регуляторних питань

Усї FDC-таблетки, якї використовуються для лїкування туберкульозу, мають бути зареєстрованї нацїональним регуляторним органом. Додатково до загальних вимог з реєстрації фармацевтичних продуктів, при реєстрації FDC-таблеток необхідно також оцїнювати бїодоступнїсть рїфампїцину згїдно протоколу, рекомендованому ВООЗ. На обговореннї була порушена проблема дослїдження стабїльностї FDC-таблеток. ВООЗ і партнери повиннї надалї визначити необхіднїсть вклучення даних зї стабїльностї до реєстраційного досьє протитуберкульозних FDC-таблеток.

Було висловлене занепокоєння щодо вимог Європейських регуляторних органів проводити клінічні випробування при реєстрації комбінованих препаратів. На думку робочої групи, чотирикомпонентні FDC-таблетки мають реєструватися без будь-яких подальших клінічних випробувань, тому що FDC-таблетки є комбінацією генеричних фармацевтичних продуктів, ефективність і безпека яких були доведені і дія ретельно досліджена як для індивідуальних лікарських засобів, так і для застосованих разом. Удосконалення професійного рівня співробітників регуляторних органів та навчання з питань, пов'язаних із FDC-таблетками, мають проводитися в міжнародних навчальних центрах, подібних Глобальній навчальній мережі, створеній Департаментом ВООЗ із вакцин та інших біологічних препаратів. Зважаючи на критичність глобальної ситуації з туберкульозом, національні регуляторні органи мають розглянути можливість використання прискореного процесу ухвалення чотирикомпонентних FDC-таблеток для лікування туберкульозу. Високі реєстраційні збори на протитуберкульозні препарати були названі основною перешкодою для виробників, які могли б пропонувати свої препарати для реєстрації. Національні регуляторні органи мають розглянути зменшення або скасування цих реєстраційних зборів, особливо для чотирикомпонентних FDC-таблеток. До того ж, уряди повинні розглянути питання щодо зменшення податку на імпорт для протитуберкульозних препаратів, особливо для чотирикомпонентних FDC-таблеток.

ВООЗ має негайно оцінити можливості створення системи попередньої кваліфікації виробників протитуберкульозних FDC-таблеток, яка може керуватися UNICEF або іншими органами ООН, або ВООЗ спільно з органами ООН. Чотирикомпонентні FDC-таблетки мають бути запропоновані для включення до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ на наступній нараді Експертного комітету з використання життєво необхідних ліків у листопаді 1999 року. Для спрощення цього процесу ВООЗ і партнери повинні скласти документ, який обґрунтував би включення чотирикомпонентних FDC-таблеток до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ, і зібрати добірку всіх відповідних публікацій для підтримки цієї дії. Ця документація має також бути доступною для національних регуляторних органів та

фармацевтичних виробників і постачальників, щоб сприяти швидкій реєстрації чотирикомпонентних FDC-таблеток в їх країнах. ВООЗ слід зробити заяву, яка би рекомендувала однокомпонентні таблетки замінити FDC-таблетками та використовувати останні як первинні лікарські засоби для лікування туберкульозу.

#### *Робоча група з проблем забезпечення якості*

Загально визнана необхідність проведення попередньої кваліфікації виробників, яка має вимагати наявності чітких специфікацій, ретельного контролю якості продукції та адекватного нагляду. Процедура, встановлена Департаментом ВООЗ із вакцин та інших біологічних препаратів, розглядалася як модель, яка могла б бути корисною при запровадженні системи попередньої кваліфікації для протитуберкульозних препаратів. Після встановлення і впровадження системи попередньої кваліфікації для виробників протитуберкульозних препаратів, організації з постачання мають закуповувати продукцію виключно у попередньо кваліфікованих виробників, щоб гарантувати її якість.

Завжди має бути продемонстрована біоеквівалентність рифампіцину. На сьогодні невідома методика оцінки кінетики лікарських засобів без використання людей як суб'єктів досліду, що давала би змогу одержувати результати, які б корелювали з результатами вивчення біоеквівалентності. Тому оцінка засвоюваності препарату може бути зроблена тільки шляхом відповідних клінічних випробувань. Тест на розчинення (*in vitro*) може бути корисний для встановлення відповідності препарату від серії до серії, але він не може замінити дослідження біодоступності. Для забезпечення якості мають застосовуватися міжнародні критерії. Різні експертні комітети, що мають справу з подібними проблемами (наприклад, експертні комітети з фармацевтичних препаратів і ті, що займаються туберкульозом), повинні регулярно взаємодіяти і спілкуватися, щоб гарантувати, що вимоги до виробництва і забезпечення якості протитуберкульозних FDC-таблеток відповідають глобально погодженим критеріям.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) не має використовуватися як інструмент для встановлення якості лікарського засобу, наприклад, при реєстрації та/або дистрибуції. ТШХ не дозволяє перевірити біодоступність, але може бути корисна для виявлення явних

дефектів якості, особливо якщо не проводять-ся інші випробування.

При лікуванні туберкульозу необхідною умовою є регулярне і постійне постачання ліків. Щоб гарантувати постійне виробництво, виробники повинні мати щонайменше двох постачальників високоякісної сировини; якщо один із будь-якої причини не в змозі задовольнити попит, виконати замовлення зможе інший. Ця рекомендація ставить додаткове питання, чи потрібні окремі дослідження біодоступності при заміні постачальника сировини рифампіцину. Доки процес виробництва залишається незмінним, і новий постачальник поставляє рифампіцин ідентичної кристалічної форми і належної якості, не має необхідності проводити нові випробування на біодоступність.

Регуляторні вимоги щодо сировини мають залишатися мінімальними, але вони мають повністю відповідати фармакопейним специфікаціям. Врешті-решт виробник є відповідальним за якість лікарських засобів, які він виробляє, і, до того ж, надмірна регламентація сировини і кристалічної форми рифампіцину, який використовується в виробництві FDC-таблеток, була б шкідливою, оскільки це б призвело до зниження конкуренції і зростання цін. Зараз у виробництві рифампіцин-місних FDC-таблеток використовують обидві кристалічні форми рифампіцину (1 і 2). Фармакопея США вимагає в усіх препаратах рифампіцину використовувати кристалічну форму 2.

Вимоги специфікацій мають включати не лише переконливі підтвердження зазначеного вмісту лікарського засобу, швидке і повне вивільнення діючих компонентів (профіль розчинення), але потребують також демонстрування стабільності препаратів протягом 24 міс при зберіганні в типових тропічних умовах (висока температура, висока вологість). Це могло б бути додатковою вимогою до специфікацій ІСН (Міжнародна конференція з гармонізації).

Мають бути розширені національні можливості системи контролю GMP. Як потенційне джерело для навчання міг би бути використаний досвід, яким володіють виробники лікарських засобів та співробітники мережі дистрибуції вакцин.

Має здійснюватися постійний післяпродажний нагляд за якістю FDC-таблеток. Слід продумати вид, розміщення, матеріально-технічне забезпечення і періодичність післяпро-

дажного нагляду, необхідного для впевненості, що зареєстровані виробники FDC-таблеток підтримують належну якість своєї продукції. Проте, поки що неясно, хто це буде оплачувати.

У подальшому необхідно розглянути можливість стандартизації фізичних властивостей і дозувань FDC-таблеток. Відносні переваги і недоліки посилення вимог стандартизації як фізичних властивостей FDC-таблеток (колір, зовнішній вигляд і розмір), так і їх упаковки потребують подальшого обговорення. Нанесення роздільних рисок на FDC-таблетках прийнятне для педіатричних препаратів, але не для препаратів для дорослих. Звичайний поділ таблетки навпіл неприпустимий у зв'язку із призначенням FDC-таблеток забезпечувати відповідний простий і стандартизований прийом препарату. Проміжні дозування сприяють індивідуальному підходу в лікуванні і підвищують можливість помилок при розрахунку дози. Розділення доз, згідно схем дозування ВООЗ, може знадобитися для маленьких дітей із масою тіла менше 10 кг.

#### НАСТУПНІ КРОКИ/ЗОБОВ'ЯЗАННЯ

##### *ВООЗ зобов'язується:*

- Розробити стислий, орієнтований на дії, звіт про нараду, який включатиме коментарі учасників.
- Розробити обґрунтований документ стосовно використання FDC-таблеток.
- Скласти повідомлення, що містить рекомендації ВООЗ, об'ємом в одну сторінку для видання SCRP.
- Розробити монографію для окремих Фармакопей.
- Проводити роботу з розширення мережі лабораторій.
- Сприяти співробітництву в межах ВООЗ, особливо між Кластером захворювань, що передаються (CDS), і Кластером технологій охорони здоров'я та лікарських засобів (НТР) із питань постачання і попередньої кваліфікації, беручи до уваги досвід в галузі вакцин.
- Досліджувати можливі робочі проекти, які забезпечать обґрунтування користі FDC-таблеток, у тому числі для запобігання появі штамів бактерій ТБ, резистентних до багатьох ліків.
- Скликати засідання ІСН і регуляторних органів країн, що розвиваються, для визначення необхідних дій для сприяння швидкій реєстрації FDC-таблеток.

ВООЗ і фармацевтична промисловість спільно будуть:

- Розробляти мастер-файл технічної документації (який включатиме випробування ефективності тощо), що сприятиме внесенню рекомендованих чотирикомпонентних FDC-таблеток до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ 1999 року.
- Розглядати шляхи роботи з національними регуляторними органами відносно можливості прискореної реєстрації (fast-track registration) цих препаратів.

Виробники будуть:

- Додатково через інформаційні канали повідомляти про майбутні розробки.

ВООЗ також закликає Центри з контролю захворювань (CDC) Сполучених Штатів Америки продовжувати роботи з післяпродажного нагляду, включаючи можливе видання публікацій.

ЛІТЕРАТУРА

- Mitchison D.A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1998. - No. 2. - P.10-15.
- Norval P., Blomberg B., Kitler M., Dye C., Spinaci S. Estimate of the global market for fixed dose combination (FDC) tablets // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
- World Health Organization. Essential Drugs. WHO Model List (revised in December 1997) // *WHO Drug Information.* - 1998. - No. 12. - P. 22-25.
- The promise and the reality of fixed-dose combinations with rifampicin. A joint statement of the International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases and the Tuberculosis Program of the World Health Organization // *Tuberc. Lung Dis.* - 1994. - No. 75. - P.180-181.
- Maher D., Chaulet P., Spinaci S., Harries A.D. Treatment of tuberculosis. Guidelines for National Programs. - Geneva: World Health Organization, 1997. - P.25-31; 71-74.
- World Health Organization. Managing Tuberculosis at National Level. Plan Supplies (WHO training modules for TB managers). Global Tuberculosis Program (GTB). - Geneva: World Health Organization, 1996. - P.24-25.
- Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom: Recommendations 1998 // *Thorax.* - 1998. - No. 53. - P. 536-548.
- Moulding T., Dutt A.K., Reichman L.B. Fixed-dose combinations of antituberculous medications to prevent drug resistance // *Ann. Intern. Med.* - 1995. - No. 122. P. 951-954.
- Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council. Acceptability, compliance, and adverse reactions when isoniazid, rifampin, and pyrazinamide are given as a combined formulation or separately during three-times-weekly antituberculosis chemotherapy // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1989. - No. 140. - P. 1618-1622.
- Symposium on combination products for the treatment of tuberculosis, 6-7 December 1994. - Geneva, Switzerland: International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Association (IFPMA).
- Uplekar M.W., Shepard D.S. Treatment of tuberculosis by private general practitioners in India // *Tubercle.* - 1991. - No. 72. - P. -284-290.
- Girling D.J. The role of pyrazinamide in primary chemotherapy for pulmonary tuberculosis // *Tubercle.* - 1984. - No. 65. - P. 1-4.
- Chaulet P., Boulahbal F. Essai clinique d'une combinaison en proportions fixes de trois médicaments dans le traitement de la tuberculose [Clinical trial of a combination of three drugs in fixed proportions in the treatment of tuberculosis]. Groupe de Travail sur la Chimiothérapie de la Tuberculose // *Tuberc. Lung Dis.* - 1995. - No. 76. - P. 407-412.
- Kitler M.E. The fixed dose combination project. - Geneva: World Health Organization, 1998. (Unpublished document).
- Monograph on rifampicin, isoniazid and pyrazinamide fixed dose combination tablet // *United States Pharmacopoeia Dispensing Information (USP-DI).* - Rockville: The United States Pharmacopoeia Convention, Inc. - 1999. - P. 1-10.
- World Health Organization. Report and recommendations from the meeting of the Technical Research and Advisory Committee (TRAC), 17-19 August 1998, Geneva. - Geneva: World Health Organization, 1998. (Unpublished document).
- Acocella G. Human bioavailability studies. IUATLD Symposium "Quality control of antituberculosis drugs", Dubrovnik, 6 October 1988 // *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* - 1989. - No. 64. - P. 38-40.
- Acocella G., Conti R., Luisetti M., Pozzi E., Grassi C. Pharmacokinetic studies on antituberculosis regimens in humans. I. Absorption and metabolism of the compounds used in the initial intensive phase of the short-course regimens: single administration study // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1985. - No. 132. - P. 510-515.
- Ellard G.A., Ellard D.R., Allen B.W., et al. The bioavailability of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in two commercially available combined formulations designed for use in the short-course treatment of tuberculosis // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1986. - No. 133. - P. 1076-1080.
- Acocella G., Nonis A., Gialdroni-Grassi G., Grassi C. Comparative bioavailability of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy. I. Single-dose study // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1988. - No. 138. - P. 882-885.
- Acocella G., Nonis A., Perna G., Patane E., Gialdroni-Grassi G., Grassi C. Comparative bioavailability of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy. II. Two-month, daily administration study // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1988. - No. 138. - P. 886-890.
- Fox W. Tuberculosis in India, past, present and future // *Ind. J. Tub.* - 1990. - No. 37. - P. 175-213.
- Fox W. Drug combinations and the bioavailability of rifampicin // *Tubercle.* - 1990. - No. 71. - P. 241-245.
- Schall R., Muller F.O., Duursema L., et al. Relative bioavailability of rifampicin, isoniazid and ethambutol from a combination tablet vs. concomitant administration of a capsule containing rifampicin and a tablet containing isoniazid and ethambutol // *Arzneimittelforschung.* - 1995. - No. 45. - P. 1236-9.
- Zwolska Z., Niemirowska-Mikulska H., Augustynowicz-Kopec E., et al. Bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from fixed-dose combination capsules // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1998. - No. 2. - P. 824-30.

26. Pillai G., Padayatchi N., Onyebujoh P., et al. Recent bioequivalence studies on fixed dose combination (FDC) anti-tuberculosis drug formulations available on the global market // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
27. Ellard G.A. Quality assurance: Protocol for assessing the rifampicin bioavailability of combined formulations in healthy volunteers // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
28. McIlleron H., Gabriels G., Smith P., Fourie B., Ellard G. A standardised screening protocol for the in vivo assessment of rifampicin bioavailability // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
29. Panchagnula R., Kaur K.J., Singh I., Kaul C.L. The WHO simplified study protocol in practice: The investigation of combined formulation supplied by WHO and conducted at NIPER (National Institute of Pharmaceutical Education and Research) // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
30. Smith P., van Dyke J., Fredericks A. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
31. Ellard G.A. The evaluation of the rifampicin bioavailabilities of fixed dose combinations of antituberculosis drug: Procedures for ensuring laboratory proficiency // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
32. Ellard G.A., Fourie P.B. Rifampicin bioavailability: A review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
33. Fourie P.B. Registration requirements for fixed dose combination anti-tuberculosis formulations // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
34. Trebucq A., Chaudron J., Pinel J. Requirements for anti-tuberculosis drug tender requests // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
35. Blomberg B., Kitler M.E., Milstien J., et al. Availability of quality fixed-dose combination tablets for the treatment of tuberculosis: What can we learn from studying the World Health Organizations vaccine model? // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
36. Chaulet P. Implementation of fixed dose combinations in tuberculosis control: outline of responsibilities // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
37. Fourie P.B., Spinaci S. Structures required, roles and responsibilities in maintaining laboratories for quality assurance of antituberculosis FDCs in accordance with the WHO/IUATLD statement // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
38. Catalani E.T. Review of the tuberculostatics market. Focus on the utilisation of rifampicin based products // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
39. Bumgarner R. Developing a rationale response to the fourth element of DOTS (a secure supply of quality TB drugs) or, the need for a Global Drug Facility. Unpublished document, Stop TB Initiative (STB). - 1999. - P. 1-12.
40. Pelizza G., Nebuloni M., Ferrari P., Gallo G.G. Polymorphism of rifampicin // *Farmaco [Sci]*. - 1977. - No. 32. - P. 471-81.
41. Long M.W., Snider D.E., Farer L.S. U.S. Public Health Service cooperative trial of three rifampicin-isoniazid regimens in treatment of pulmonary tuberculosis // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1979. - No. 119. - P. 879-894.
42. Sirgel F.A., Botha F.J., Parkin D.P., et al. The early bactericidal activity of rifabutin in patients with pulmonary tuberculosis measured by sputum viable counts: a new method of drug assessment // *J. Antimicrob. Chemother.* - 1993. - No. 32. - P. 867-875.
43. World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Assuring bioavailability of fixed-dose combinations of antituberculosis medication. Scientific statement // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1999. - Supplement (in preparation).
44. World Health Organization. Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirement to establish interchangeability // WHO Technical Report Series. - 1996. - No. 863.

## Коментар Сура С.В., заступника Головного державного інспектора України з контролю якості лікарських засобів, експерта ВООЗ в Україні

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я (ВООЗ) останні десятиріччя приділяє боротьбі з туберкульозом (ТБ) дуже велику увагу. Для лікування ТБ ВООЗ ухвалила і рекомендує країнам, що розвиваються, використовувати так звану стратегію DOTS, яка передбачає застосування ліків пацієнтом під наглядом лікаря або спеціально підготовленого фахівця. Наведений переклад документа ВООЗ стосується питань створення, виробництва, контролю якості, реєстрації та застосування комбінованих лікарських препаратів (що містять в одній таблетці 2-4 активних компоненти) для лікування ТБ в рамках стратегії DOTS.

Провідні українські фахівці з проблеми ТБ сьогодні досить скептично відносяться до стратегії DOTS, вказуючи на ряд її недоліків.

Однак, на нашу думку, наведена в представленому документі інформація є універсальною і може бути корисною для українських лікарів, провізорів та виробників лікарських засобів, незалежно від стратегії лікування, яку використовують.

Основними взаємопов'язаними тезами цього документу є такі:

1. Успішне лікування ТБ можливе лише за допомогою комбінованої терапії. Будь-які відхилення від лікування значно посилюють ризик виникнення резистентних штамів бактерій ТБ.

2. Для лікування ТБ рекомендується використовувати комбіновані таблетки з фіксованим дозуванням.

3. В комбінованих таблетках бажано використовувати дозування активних компо-

ментів, що включені до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ.

4. Виробництво комбінованих таблеток із фіксованим дозуванням має здійснюватися відповідно до вимог GMP.

5. При реєстрації комбінованих таблеток із фіксованим дозуванням слід обов'язково брати до уваги результати досліджень біоеквівалентності. Експерти регуляторного органу повинні пройти необхідний тренінг.

6. При проведенні закупівлі (в т.ч. через проведення тендерів) рекомендується використовувати систему попередньої кваліфікації виробників FDC-таблеток.

Згідно даних "Бізнес Кредіт Ко" [1] у 1999 році аптеками України було реалізовано протитуберкульозних ліків на суму, еквівалентну 1162 тис. доларів США. Із них доля українських препаратів склала 62 %.

Доля продажу комбінованих препаратів в Україні склала менше 3 % (за вартістю), у той час, як у 1998 році в світі для лікування близько 24 % випадків захворювань ТБ використовувалися комбіновані препарати, що містили рифампіцин. На сьогодні комбіновані протитуберкульозні препарати українськими підприємствами не виробляються.

У зв'язку із загостренням проблеми ТБ в Україні і в світі, створенням національних та міжнародних програм з боротьби з ТБ можна очікувати збільшення споживання відповідних лікарських засобів у нашій країні, країнах СНД, Африки та Азії.

У 2000 році МОЗ України оголосило тендер на централізовану закупівлю протитуберкульозних препаратів на суму 27 млн. грн, ряд тендерів для закупівлі цих ліків проводять обласні адміністрації та відомства. МОЗ також сподівається на одержання цільового кредиту Світового банку на суму 3.5 млн. доларів США, частину якого планується використати для фінансування проектів з боротьби із ТБ [2].

Для Росії Міжнародний банк виділив на 5 років кредит на суму 150 млн. доларів США, більша частина якого буде використана для закупівлі препаратів для лікування ТБ [3]. Російське ВАТ «Акріхін» вже розробило два комбінованих препарати (ізоніазид 0.15 г + етамбутол 0.4 г та ізоніазид 0.15 г + піразинамід 0.5 г), які проходять процедури узгодження в МОЗ РФ.

При проведенні тендерів на закупівлю протитуберкульозних лікарських засобів за рахунок іноземних кредитів обов'язковими

вимогами для учасників будуть наявність виробництва відповідно до вимог GMP і надання результатів дослідження біоеквівалентності, додатковою умовою може стати закупівля лікарських засобів у вигляді комбінованих препаратів, як це рекомендує ВООЗ.

На жаль, надання даних із вивчення біоеквівалентності, які дозволяють кількісно оцінити подібність генерика оригінальному препаратів, не є обов'язковою вимогою при реєстрації генериків в Україні. В нашій країні звичайно проводять клінічні випробування ефективності генериків (тобто їх якісну оцінку - діє/не діє), яка вже і так відома. Тому майже всі генерики вітчизняного виробництва (у тому числі проти-ТБ препарати) на сьогодні не мають підтвердження їх біоеквівалентності оригінальним препаратам-компаратам, рекомендованим ВООЗ [4] і, таким чином, підтвердження, що при їх використанні можна очікувати передбачений терапевтичний ефект.

Зважаючи на рекомендації ВООЗ, наведені у представленому звіті і пов'язаних із ним документах, та ситуацію на вітчизняному та інших ринках протитуберкульозних препаратів можна висловити такі пропозиції:

#### *Українським виробникам лікарських засобів*

- Починати роботу зі створення комбінованих лікарських засобів для лікування ТБ із дозуваннями, які включені до Модельного переліку життєво необхідних ліків ВООЗ.
- При поетапному впровадженні GMP передбачити, у першу чергу, приведення до цих вимог дільниць, де виробляються протитуберкульозні препарати.
- Якщо українські підприємства планують виходити на ринки інших країн та брати участь у міжнародних тендерах, то, крім впровадження вимог GMP, слід передбачити проведення дослідження біоеквівалентності лікарських препаратів у лабораторіях, які пройшли відповідну акредитацію, за стандартними протоколами, розробленими ВООЗ. Це стосується як комбінованих, так і однокомпонентних препаратів для лікування ТБ.
- Для забезпечення стабільності виробництва мати, як мінімум, двох постачальників проти-ТБ лікарських субстанцій (якщо один з будь-якої причини не в змозі задовольнити попит, виконати замовлення зможе інший)

### Органам із реєстрації та контролю якості лікарських засобів

- При реєстрації протитуберкульозних комбінованих таблеток із фіксованим дозуванням обов'язково брати до уваги результати досліджень їх біоеквівалентності.
- Експерти регуляторного органу повинні пройти необхідний тренінг для проведення експертизи реєстраційних документів на препарати для лікування ТБ.
- При інспектуванні виробників особливу увагу приділяти контролю виробництва протитуберкульозних препаратів та відбирати зразки для контролю в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України.

### Керівникам тендерних комітетів

- При прийнятті рішень про закупівлю протитуберкульозних препаратів брати до уваги результати попередньої кваліфікації виробників.
- До заяв для участі в тендерах від виробників слід запитувати такі дані:
  - Порівняльні результати вивчення біодоступності рифампіцину та результати випробувань з розчинення інших компонентів.

- Декларації від виробника про відповідність перших і наступних серій.
- Дані, що підтверджують кореляцію результатів випробувань з розчинення різних серій протягом деякого часу.
- Заяву, що сировина, яка використовується для виробництва, відповідає вимогам специфікацій.
- У зв'язку з відсутністю на українських підприємствах GMP, при складанні контрактів на поставку протитуберкульозних препаратів передбачити, як альтернативну умову, поставку лікарських засобів для лікування ТБ із сертифікатами аналізу лабораторій Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Pharmaceutical Market of Ukraine. Survey, Fourth Quarter 1999. - KSK Trading S.A., 2000.
2. Інтерв'ю з Міністром охорони здоров'я // Аптека. — 2000. - № 24. - С. 4.
3. Рынок противотуберкулезных препаратов // Ремедиум. — 2000. - № 7-8. - С. 28-32.
4. Report of Informal Discussions on the Selection of Comparator Pharmaceutical Product for Equivalence Assessment of Interchangeable Multi-source (Generic) Products. — Geneva: World Health Organization, 1999.

УДК 543.544.615.01

Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Левин М.Г., Доценко Т.Н.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков  
ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## Аттестация фармацевтических стандартных образцов: изучение однородности

В рамках создания национальной системы стандартных образцов (СО) лекарственных средств (ЛС) рассмотрены вопросы контроля однородности содержания целевого вещества в различных упаковках СО. Дан критический анализ состояния этого вопроса в различных отечественных и международных руководствах и показано, что последние мало применимы к фармацевтическим СО, поскольку не учитывают специфику ЛС и методов их контроля. Предложен подход к контролю однородности содержания фармацевтических СО, учитывающий эту специфику.

Аттестация стандартных образцов (СО) невозможна без разработки критериев, определяющих пригодность данного СО для предполагаемого применения. Для СО, используемых для количественного определения, основной метрологической характеристикой является неопределенность содержания целевого вещества (погрешность аттестованного значения) - ( $\Delta_{Att}$ ) [1, 2, 3]. Величина  $\Delta_{Att}$  включает в себя погрешность, связанную с аналитической процедурой аттестации, и неопределенность, связанную с неоднород-

ностью содержания целевого вещества в упаковке СО. Ранее были разработаны требования к  $\Delta_{Att}$  [4, 5], а также процедуры контроля неопределенности, связанной с установлением содержания целевого вещества. Однако при этом не решались вопросы, связанные с контролем однородности СО, что затрудняет проведение объективной аттестации СО.

В большинстве случаев для аттестации фармацевтических СО используют субстанции, которые являются достаточно однородными, и неопределенность, связанная с нео-



днородностью СО, является незначимой. Однако, в некоторых случаях неоднородность может быть значимой и связана, в основном, с процедурой фасовки СО (например, в случае гигроскопичных веществ или при приготовлении СО с указываемым точным его содержанием в единице упаковки). Процедуры изучения неоднородности СО, принятые в бывшем СССР и в Украине [6, 7], связаны с изучением неоднородности исходного (нерасфасованного) материала. Подходы, описанные в руководстве ISO [1], охватывают весь спектр СО — от чрезвычайно неоднородного исходного материала до потенциально однородного материала, для которого проверка на неоднородность для уже расфасованного СО является процедурой контроля качества, призванной выявить непредвиденные проблемы при аттестации. Однако для фармацевтических СО требуется конкретная реализация данных подходов.

Это потребовало разработки процедуры изучения неоднородности для фармацевтических СО. В данной статье критически рассмотрены имеющиеся подходы к изучению неоднородности СО и предложена концепция для контроля неоднородности фармацевтических СО. Данная концепция использована при аттестации СО Государственной Фармакопеи Украины (ФСО ГФУ).

### *Введение*

#### Необходимость изучения неоднородности для фармацевтических СО

Система фармакопейных СО (ФСО) является двухуровневой и предусматривает использование официальных СО (для Украины это, в первую очередь, ФСО ГФУ и ФСО Европейской Фармакопеи — ФСО ЕФ) и рабочих СО (РСО) [8, 9]. Официальные СО предназначены для выполнения всех официальных и арбитражных анализов и для аттестации РСО. РСО могут использоваться для проведения текущих анализов только в пределах предприятия при условии, что РСО аттестованы по ФСО. При этом ФСО по своему статусу являются отраслевыми СО, а РСО — СО предприятия [10]. ФСО аттестуются органом, вводящим в действие ФСО (в Украине — ГП НЭФЦ), а РСО — предприятием. В связи с этим изучение неоднородности является важным как при аттестации ФСО, так и РСО.

СО в фармацевтическом анализе используются «... для обеспечения требуемой правильности и воспроизводимости результатов измерений» [11]. Учитывая узкие допуски со-

держания действующего вещества в готовых лекарственных средствах и особенно в субстанциях, к метрологической охарактеризованности СО, используемых для количественного определения, предъявляются очень жесткие требования. Однако ответить на вопрос, соответствует ли данный СО своему предназначению, невозможно, не имея четко определенных критериев качества. Данные критерии для фармацевтических СО были сформулированы нами ранее [1, 4, 5], при этом используемый подход соответствует подходу Европейской Фармакопеи (ЕФ) [11].

Основным критерием пригодности СО, используемых для количественного определения, является неопределенность содержания целевого вещества (погрешность аттестованного значения) -  $\Delta_{Att}$ . При этом требования к максимально допустимой  $\Delta_{Att}$  определяются допусками содержания анализируемого вещества в спецификации на субстанцию или готовое лекарственное средство [4, 5].

Для фармацевтических СО основной составляющей  $\Delta_{Att}$  обычно является неопределенность, с которой присваивается содержание основного вещества при аттестации нерасфасованного СО ( $\Delta_{bulk}$ ).  $\Delta_{bulk}$  контролируется при аттестации ФСО ГФУ в соответствии с внутренней процедурой качества. В большинстве случаев для аттестации фармацевтических СО используют субстанции, которые являются достаточно однородными, и неопределенность, связанная с неоднородностью СО, является незначимой. Однако неоднородность может быть значимой, например, в следующих случаях:

1. В упаковку СО вносится точно известное количество СО; при использовании такого СО содержание всей упаковки количественно переносится, и в последующих расчетах используется указанное в паспорте на СО содержание действующего вещества в единице упаковки. Это основной подход при использовании дорогостоящих СО, позволяющий уменьшить минимально допустимое содержание СО в упаковке.

2. СО — гигроскопичное вещество. На качество такого СО потенциально могут влиять условия фасовки.

Примером СО, для которых используется все содержимое упаковки, является ФСО ГФУ примеси трамадола гидрохлорида (цис-изомер). В упаковке СО содержится 1 мг цис-

изомера (точно указываемое содержание в упаковке) и 99 мг трамадола гидрохлорида.

Примером СО, для которого процедура фасовки может являться источником неоднородности, является СО цианкобаламина (витамина В<sub>12</sub>) (гигроскопичное вещество).

Для СО таких типов процедуры контроля качества обязательно должны включать контроль неоднородности, причем для уже расфасованного СО. Однако для этого необходимо:

1. Установить требования к допустимой неоднородности СО, согласованные с требованиями к  $\Delta_{\text{Att}}$ .
2. Разработать методику изучения неоднородности.

Отметим, что при изучении неоднородности можно выделить следующие случаи:

1. Неоднородность практически незначима, т.е. при установлении степени охарактеризованности СО ее можно не учитывать.
2. Неоднородность практически значима, т.е. при установлении степени охарактеризованности СО ее необходимо учитывать.

3. Неоднородность статистически значима — это означает, что полученные результаты позволяют вычленить неопределенность, связанную исключительно с неоднородностью СО. При этом неоднородность может быть как практически значима, так и незначима.

Основными документами, регламентирующими изучение однородности СО, являются:

1. Руководство ISO 34 «Общие требования к компетентности производителя СО» [12] и руководство ISO 35 «Сертификация СО — общие и статистические принципы» [2]. Поскольку аттестация СО ЕФ проводится в соответствии с требованиями ISO [12, 13], данные руководства являются обязательными и для аттестации ФСО ГФУ.

2. Отраслевые методические указания (ОМУ) Министерства медицинской промышленности СССР «Оценка однородности материала стандартных образцов лекарственных веществ. Общие требования» [7], регламентирующие изучение однородности для фармацевтических СО в бывшем СССР, которые практически идентичны действующему в Украине ГОСТ 8.531-81 «Однородность стандартных образцов состава дисперсных материалов. Методика выполнения измерений» [6].

Рассмотрим подходы к изучению однородности СО, используемые в данных документах.

### Подход ГОСТ 8.531-81

Основные положения ГОСТ можно сформулировать следующим образом.

Изучение однородности СО проводится обязательно для всех СО перед фасовкой. Для изучения однородности используется дисперсионный анализ. При этом предполагается, что неопределенность пробоподготовки незначима по сравнению с результатами измерений. Это дает возможность для каждой пробы выполнить необходимое число измерений и из полученных результатов вычленить статистически значимую дисперсию, связанную с неоднородностью СО. Отметим, что следствием данного подхода является использование достаточно большого числа проб — от 11 до 90 (!). Для оценки  $\Delta_{\text{Att}}$  доверительные интервалы пересчитывают на дисперсии, складывают, затем суммарную дисперсию с использованием приближений пересчитывают на доверительный интервал. Если неоднородность является практически незначимой, она не принимается в расчет при оценке  $\Delta_{\text{Att}}$ .

При использовании подхода ГОСТ/ОМУ для аттестации фармацевтических СО возникают следующие проблемы, связанные с их спецификой:

1. В большинстве случаев для аттестации СО используются фармацевтические субстанции. Данные субстанции обладают столь высокой однородностью, что ее изучение для нерасфасованного материала обычно не требуется.

2. Для СО, используемых для количественного определения в субстанциях, требования к максимально допустимой неопределенности аттестованного значения СО столь высоки, что изучение однородности по методике [7] во многих случаях невозможно (т.е. невозможно статистически значимо охарактеризовать неоднородность). Эти высокие требования приводят к тому, что основным источником неопределенности результатов анализа нередко становится неопределенность пробоподготовки, которая вносит систематическую погрешность во все результаты измерений для данной пробы. В результате, предположение о незначимости погрешности пробоподготовки становится некорректным, и использование дисперсионного анализа в указанном виде [7] становится неприемлемым, поскольку найденная дисперсия будет характеризовать не однородность СО, а погрешность пробоподготовки. В таком случае

для контроля неоднородности необходимо использовать иные статистические подходы.

3. Если неоднородность является практически незначимой, то нет необходимости устанавливать ее величину, необходимо лишь подтвердить, что она не превышает критического значения. Это позволяет существенно уменьшить требуемое для анализа число проб. Оно должно быть таким, чтобы полученная выборка подчинялась нормальному распределению и могла бы быть охарактеризована дисперсией (т.е. не менее 5 [14]).

4. При оценке суммарной неопределенности по данным, полученных из небольших выборок, число степеней свободы (которое нередко разное для слагаемых) сильно влияет на неопределенность. В силу этой и других причин гораздо нагляднее и проще использовать сумму квадратов доверительных интервалов, а не дисперсий [15, 16].

5. Для многих фармацевтических СО критической операцией, влияющей на качество, является фасовка. Это означает, что проверку однородности для таких СО необходимо проводить после фасовки и с использованием иных статистических подходов.

### Подход ISO

Требования руководства ISO носят рекомендательный характер и применимы как для очень однородных, так и для очень неоднородных СО.

Основные положения руководства ISO можно сформулировать следующим образом.

Неопределенность содержания для СО рассчитывается с учетом как неоднородности, так и других факторов. Если СО является чистым веществом, изучение однородности проводится, в основном, с целью установления неоднородности содержания примесей, наличия взаимодействия или наличия иной нерегулярности. Если предполагается, что СО по своей природе является однородным, изучение неоднородности проводится с целью выявления неожиданных проблем, например, загрязнение СО на этапе фасовки, неполное растворение или отсутствие равновесия при приготовлении раствора СО. Если предполагается, что СО по своей природе является неоднородным, изучение неоднородности проводится с целью не столько ее выявить, сколько оценить количественно. Для этого может потребоваться более трудоемкое изучение, чем просто изучение для выявления неоднородности.

Неоднородность может проявляться разными способами:

- различные навески (порции) СО из единицы упаковки могут отличаться по значению аттестованной характеристики;
- различные единицы СО могут отличаться по значению аттестованной характеристики.

Неоднородность, связанная с навеской СО, можно регулировать массой навески СО, используемой для анализа — чем больше навеска, тем меньше неоднородность. Часто перед изучением неоднородности проводят изучение влияния массы навески используемой порции СО (т.е. устанавливают минимально допустимую навеску СО, которую можно использовать для анализа в соответствии с АНД).

Оценка неоднородности может проводиться в несколько стадий.

Предварительное изучение неоднородности. Проводится после гомогенизации (которая является этапом приготовления СО) всего объема серии аттестуемого СО. Пробы из серии должны отбираться из мест, для которых предполагается максимальное различие в свойствах. Случайный отбор проб должен использоваться только в том случае, когда эти различия неизвестны или предполагается, что они отсутствуют. Число отбираемых образцов и количество повторных измерений должно быть такое, чтобы позволить выявить неоднородность не менее заданной величины. Если серия СО неоднородна на этом этапе, то она не должна расфасовываться.

Основное изучение неоднородности. Проводится после фасовки аттестуемого СО, независимо от результатов предварительного изучения. Целью ее является подтверждение, что варьирование содержания между единицами СО практически незначима. Единицы из серии отбирают случайным образом. Различают три случая:

1. Практически однородный материал — неоднородность незначима и ею можно пренебречь по сравнению с неопределенностью анализа (при аттестации) или с максимально допустимой неопределенностью для аттестованной характеристики.

2. Практически неоднородный материал — неоднородность значима и является основным компонентом суммарной неопределенности для аттестованной характеристики.

3. Умеренно неоднородный материал — варьирование в свойствах имеет то же поря-

док, что и неопределенность анализа. В свою очередь, здесь различают два случая:

3.1. Можно установить тенденцию, например, закономерное изменение свойств при отборе проб по вертикали из упаковки (барабана) субстанции. В таком случае тенденция может быть, например, описана математически и учтена.

3.2. Тенденция не обнаруживается, но результаты изучения свидетельствуют о наличии неоднородности — в этом случае используется статистическая концепция «толерантных доверительных интервалов». При контроле  $n$  единиц толерантный доверительный интервал определяет интервал, в пределах которого, например, с вероятностью 0.99 находятся значения не менее 95 % популяции для аттестованной характеристики, для бесконечно большой или достаточно большой партии СО.

Отмечается, что в настоящее время некоторые исследователи возражают против использования концепции толерантных доверительных интервалов, предпочитая использовать просто коэффициент 3 или, в некоторых случаях, диапазон [2].

Если материал СО однородный, то неопределенность связана, в основном, с неопределенностью анализа и выражается с использованием обычного доверительного интервала для среднего значения. При этом обычно используется вероятность 95 %.

Необходимо отметить, что подход, описанный в ГОСТ [6], затрагивает лишь предварительную оценку однородности СО.

Как видно из приведенного выше, рекомендации ISO достаточно обширны. Однако фармацевтические СО имеют свою специфику, что требует уточнения вышеописанных подходов:

1. Как указывалось ранее, фармацевтические СО обычно являются очень однородными субстанциями. При их количественном определении с однородностью обычно не возникает проблем, если навеска СО составляет 10 мг или более [13]. Требования к минимальной навеске, в основном, обусловлены требованиями к неопределенности концентрации раствора СО, используемого для анализа [15]. Таким образом, для фармацевтических СО изучение однородности обычно требуется после расфасовки как процедура контроля качества. При этом неоднородность должна быть практически незначима.

2. Требования к  $\Delta_{Att}$  устанавливаются, исходя из пределов содержания анализируемого вещества в лекарственном средстве (ЛС), для анализа которых используются данные СО [1, 11]. При этом используется концепция доверительных интервалов. Таким образом, даже если неоднородность может быть статистически выявлена, требования к фармацевтическим СО должны устанавливаться на основе обычных, но нетолерантных доверительных интервалов.

3. Требования к практической незначимости неоднородности должны быть согласованы с пределами содержания анализируемого вещества в ЛС, для анализа которых используется данный СО.

4. Для аттестации ФСО и РСО необходимо разработать методику оценки неоднородности, учитывающую вышеизложенную специфику фармацевтических СО.

#### *Теоретическая часть*

При проведении количественного определения фармацевтические СО, как правило, применяются в виде растворов. Содержимое упаковки СО может при этом использоваться двумя различными способами:

1. полностью — содержимое упаковки количественно переносится и доводится до необходимого объема (в упаковке СО содержится указанное количество целевого вещества, например, ФСО ЕФ инсулина человека);

2. частично — для проведения анализа из упаковки берется точная навеска СО.

В первом случае для проверки однородности необходимо определять содержание СО в каждой из отобранных для контроля качества упаковок, в процентах, к указанному на упаковке значению. Во втором случае определяется процентное содержание целевого вещества в навесках, взятых из каждого отобранного флакона. Для простоты изложения мы будем далее называть и те, и другие величины концентрациями.

Отметим, что процедура проверки однородности СО по своей сути тесно связана с процедурой установления аттестованного значения. Допустим, есть возможность установить аттестованное значение, проанализировав отдельно  $n$  упаковок СО. Усреднение полученных данных дает нам аттестованное значение  $X_{Att}$ , а разброс единичных значений вокруг  $X_{Att}$  — неопределенность аттестованного значения  $\Delta_{Att}$ , из которого можно судить также и о степени однородности содержания упаковок СО (см. ниже). Данный

подход действительно применяется в некоторых случаях (например, для ФСО примеси цис-изомера трамадола гидрохлорида). Этот подход потенциально может быть применим ко всем РСО, поскольку их аттестация в обязательном порядке проводится по официальному (фармакопейному) СО. Однако данный подход не может быть использован во всех случаях. Это связано, в первую очередь, с тем, что к неопределенности аттестованного значения СО предъявляются достаточно жесткие требования ( $\pm 0.32\%$  для СО, предназначенных для анализа субстанций с верхним допуском содержания  $101\%$  и  $\pm 0.5\%$  для СО, предназначенных для анализа готовых лекарственных средств (ГЛС) с пределами содержания  $\pm 5\%$  [1, 4]).

Эти жесткие требования к неопределенности аттестованного значения СО предъявляют, в свою очередь, жесткие требования к приборам — в первую очередь к хроматографам (если анализ проводится хроматографически) [1, 4]. Учитывая достаточно большую длительность получения хроматограмм (которых необходимо получить для одного раствора тем больше, чем хуже сходимость) и время устойчивости раствора, хроматография зачастую не может быть использована для изучения однородности СО. В то же время, однородность упаковок СО достаточно просто и быстро во многих случаях можно проверить спектрофотометрически, используя в качестве стандартного образца нерасфасованный СО, относительно которого и считается разброс содержаний единичных упаковок СО. Отметим, что типичными проблемами, вызывающими неоднородность, является точность фасовки (для СО с точно указываемым содержанием в упаковке) и неоднородное поглощение воды при фасовке гигроскопичных веществ. Спектрофотометрия позволяет проконтролировать отсутствие данных проблем. Более редким случаем является неоднородность по содержанию сопутствующих примесей. Отсутствие данной проблемы может быть проконтролировано хроматографически, поскольку содержание данных примесей обычно достаточно низкое и, соответственно, к результатам анализа предъявляются гораздо менее жесткие требования.

При таком подходе получение аттестованного значения  $X_{Att}$  и проверка однородности отделяются друг от друга так же, как отдельно проводятся количественное определение дозированных готовых ЛС и проверка одно-

родности их содержания. Присвоение аттестованного значения проводится по данным анализа нерасфасованного СО, а проверка однородности — по данным анализа расфасованного СО. Неопределенность же аттестованного значения определяется по данным обоих анализов. Отметим, что по сравнению со спектрофотометрией хроматография обеспечивает существенно худшую сходимость результатов измерений, и требует гораздо больше времени. Эти факторы делают во многих случаях хроматографию вообще неприемлемой для изучения однородности.

Поэтому для проверки однородности СО целесообразно использовать спектрофотометрию вместо хроматографии, что мы и предлагаем делать там, где это возможно.

Процедура проверки однородности включает следующие этапы:

1. Проводят анализ нерасфасованного СО. Определяют  $X_{Att}$  и соответствующую ему неопределенность  $\Delta_{bulk}$ . В соответствии с развитым нами ранее подходом [1, 4, 15], эта неопределенность должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой полной погрешностью анализа лекарственного средства ( $\Delta_{As}$ ), для анализа которого используется СО, т.е.:

$$\Delta_{bulk} \leq \max \Delta_{Att} = 0.32 \cdot \Delta_{As} \quad (1)$$

Здесь и далее  $\Delta$  — соответствующий относительный доверительный интервал;  $\max \Delta_{Att}$  — максимально допустимая неопределенность аттестованного значения.

В свою очередь, требования к  $\Delta_{As}$  определяются пределами содержания анализируемого компонента в ЛС. Отметим, что сходные принципы использует и ЕФ [11].

Если  $\Delta_{bulk}$  не удовлетворяет соотношению (1), то используемая методика анализа не обеспечивает требуемую точность, и такая серия СО не может быть расфасована.

2. Если  $\Delta_{bulk}$  удовлетворяет соотношению (1), то проводят расфасовку СО и определяют содержание в нескольких упаковках (не менее 5 упаковок), используя нерасфасованный СО как стандартный образец. Естественно, что неопределенность содержания в **каждой единице** СО должна также удовлетворять соотношению (1). Рассчитывают доверительный интервал ( $\Delta_{Unit}$ ) отклонений этих единичных содержаний от аттестованного значения  $X_{Att}$ . Этот доверительный интервал  $D_{Unit}$  не должен превышать максимально допусти-

мую неопределенность аттестованного значения СО:

$$\Delta_{Unit} \leq \max \Delta_{Att} = 0.32 \cdot \Delta_{As} \quad (2)$$

Данное соотношение имеет простой смысл. Анализ  $n$  отдельных упаковок СО (доверительный интервал  $\Delta_{Unit}$ ) ничем принципиально не отличается от анализа  $n$  навесок исходного, нерасфасованного, СО (доверительный интервал  $\Delta_{bulk}$ ). Поэтому при отсутствии практически значимой неоднородности неопределенность  $\Delta_{Unit}$  не должна превосходить максимально допустимую неопределенность аттестованного значения для нерасфасованного СО ( $\max \Delta_{Att}$ ).

Если соотношение (2) не выполняется, то качество данной серии СО не может считаться приемлемым.

3. Если соотношение (2) выполняется, то это означает не только то, что полная неопределенность аттестованного значения для расфасованного СО находится в допустимых пределах, но и то, что неоднородность данного СО (одно из слагаемых данной полной неопределенности) также находится в допустимых пределах. При этом конкретное значение неопределенности, связанной с неоднородностью, не является важным и не оценивается.

Возникает закономерный вопрос, что считать неопределенностью аттестованного значения ( $\Delta_{Att}$ ) -  $\Delta_{bulk}$  или  $\Delta_{Unit}$ ? Они, в соответствии с соотношениями (1-2), не превосходят  $\max \Delta_{Att}$ , но при этом любая из них может быть больше другой. Поэтому за  $\Delta_{Att}$  целесообразно принять наибольшее из них:

$$\Delta_{Att} = \max(\Delta_{bulk} \text{ или } \Delta_{Unit}) \leq 0.32 \cdot \Delta_{As} \quad (3)$$

При этом необходимо отметить также следующее:

4. При изучении неоднородности в результате анализа дает вклад как неоднородность СО, так и неопределенность методики. При этом погрешность пробоподготовки для раствора нерасфасованного материала вносит систематическую погрешность во все результаты определения содержания для расфасованного СО. В связи с этим необходимо предъявлять требования к максимально допустимой неопределенности пробоподготовки раствора нерасфасованного материала ( $\Delta_v$ ): она должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой неопределенностью аттестованного значения, т.е., учитывая (1):

$$\Delta_v(X_{Att}) \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{Att} \leq 0.1 \cdot \Delta_{As} \quad (4)$$

Здесь  $\Delta_{As}$  - максимально допустимая полная погрешность анализа лекарственного средства, для анализа которого используется СО.

5. Величина  $\Delta_{Unit}$  включает несколько составляющих - погрешность методики  $\Delta_{Met}$  (которая включает погрешность пробоподготовки  $\Delta_v$  и погрешность конечной аналитической операции  $\Delta_{FAO}$ , для испытуемого и стандартного растворов, соответственно) и неоднородность распределения СО по упаковкам (флаконам). Для того, чтобы методика позволяла подтвердить практическую незначимость неоднородности для СО, необходимо, чтобы погрешность методики  $\Delta_{Met}$  не

Таблица 1

**Аттестуемые фармакопейные стандартные образцы**

ФСО	Для какого метода анализа предназначен	Что представляет собой	Способ использования	Цель изучения однородности
Парацетамол	СФ, ВЭЖХ	Субстанция парацетамола	Из упаковки берут точную навеску	Контроль качества
Кофеин	СФ	Субстанция кофеина безводного	Из упаковки берут точную навеску	Контроль качества
Цианокобаламин (витамин В <sub>12</sub> )	СФ, ВЭЖХ	Субстанция В <sub>12</sub> (в упаковке содержится точно известное количество ФСО)	Количественно переносят содержимое упаковки	Контроль процедуры фасовки
Цис-изомер трамадола гидрохлорида	ВЭЖХ	Смесь цис-изомера трамадола г/х и трамадола г/х (в упаковке содержится 1 мг цис-изомера трамадола г/х и около 99 мг трамадола г/х)	Количественно переносят содержимое упаковки	Контроль процедуры фасовки

превышала максимально допустимую погрешность аттестации, т.е. должно выполняться соотношение:

$$\Delta_{Met} \leq \max \Delta_{Att} \quad (5)$$

Чем меньше величина  $\Delta_{Met}$ , тем больше может быть допустимая неоднородность СО. Если же мы хотим выделить из  $\Delta_{Unit}$  неопределенность, связанную с неоднородностью, то величина  $\Delta_{Met}$  должна быть незначима по сравнению с полученным значением  $\Delta_{Unit}$ . Т.е.:

$$\Delta_{Met} \leq 0.32 \cdot \Delta_{Unit} \quad (6)$$

6. Для оценки неопределенности методики удобно использовать не сумму дисперсий [13], а сумму квадратов доверительных интервалов [4, 14, 15].

7. Для данной схемы выполнения измерений относительный доверительный интервал, в процентах, для разброса единичных содержаний основного вещества в упаковках СО от номинального значения  $X_{Att}$  будет равен:

$$\Delta_{Unit} = RSD_{Unit} \cdot t(95\%; n);$$

$$RSD_{Unit} = \sqrt{\frac{\sum D_i^2}{n}}, \quad (7)$$

где:  $RSD_{Unit}$  - относительное стандартное отклонение, полученное для результатов определения содержания в единице упаковки, в процентах от номинального содержания;

$t(95\%; n)$  - двухсторонний коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности 95 % и числа степеней свободы  $n$ ;

$D_i$  - отклонение содержания для единиц расфасованного СО от такового для нерасфасованного ФСО, в процентах;

$n$  - число проанализированных единиц СО. Необходимо отметить следующее:

- число степеней свободы равно  $n$ , поскольку отклонение находится не от среднего, а от уже известного номинального значения  $X_{Att}$ ;

- $t$  - двусторонний, поскольку для расфасованного СО возможно отклонение содержания в обе стороны.

### Экспериментальная часть

Разработанный подход изучения однородности СО был использован нами при аттестации ФСО, предназначенных для количественного определения.

### Методики изучения неоднородности

При изучении неоднородности анализ желательнее проводить в тех же условиях, в которых должен использоваться данный СО (растворитель, длина волны детектирования, условия хроматографирования). По ряду причин (см. выше) во многих случаях для изучения однородности целесообразно использовать спектрофотометрию вместо хроматографии. Однако для СО, представляющих собой смесь (ФСО цис-изомера трамадола г/х), изучение неоднородности возможно только хроматографически.

Количественное определение цис-изомера трамадола г/х проводили по ФСО трамадола г/х, поскольку у данных веществ одинаковая чувствительность определения.

Для того, чтобы проконтролировать неопределенность пробоподготовки, готовят два раствора нерасфасованного ФСО.

При использовании более одного разведения (ФСО парацетамола и кофеина) для расчета концентраций использовали весовой метод.

Отклонения от номинального содержания ( $D_i$ ) рассчитывали по формуле:

$$D_i = \frac{R_i - R_{Att}}{R_{Att}} \cdot 100\%; \quad R_{Att} = \frac{R_1 + R_2}{2}; \quad R = \frac{A}{C}, \quad (8)$$

где:  $C$  - концентрация соответствующего раствора ФСО;

$R$  - приведенное значение отклика для растворов нерасфасованного ФСО ( $R_1, R_2, R_{Att}$ ) или расфасованного ФСО ( $R_i$ ), соответственно;

$A$  - аналитический сигнал (оптическая плотность для спектрофотометрической методики или площадь пика для хроматографической методики) для соответствующего раствора ФСО.

Ниже приведены методики, использованные для изучения однородности ФСО.

### ФСО парацетамола

**Приготовление растворов.** Около 50 мг (точная навеска) нерасфасованного ФСО или расфасованного ФСО, соответственно, помещают в предварительно взвешенную мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 0.1 М раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой до метки (раствор А), после чего колбу взвешивают.

1 мл раствора А помещают в предварительно взвешенную мерную колбу вместимостью 100 мл, взвешивают, прибавляют 10 мл

0.1 М раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой до метки.

Концентрацию ФСО ( $C$ , мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{m_0 \cdot M_1}{100 \cdot M_{100}}; \quad (9)$$

где:  $m_0$  - навеска ФСО, в миллиграммах;

$M_1$  - масса одного мл раствора А, в граммах;

$M_{100}$  - масса 100 мл раствора А, в граммах.

*Выполнение измерений.* Измерения проводят методом прямой спектрофотометрии при длине волны 257 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 0.01 М раствор натрия гидроксида. Для каждого из растворов выполняют по 3 измерения с выниманием кюветы.

#### ФСО кофеина

*Приготовление растворов.* Около 50 мг (точная навеска) нерасфасованного ФСО или расфасованного ФСО, соответственно, помещают в предварительно взвешенную мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл 0.01 М раствора кислоты хлористоводородной и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (раствор А), после чего колбу взвешивают.

2 мл раствора А помещают в предварительно взвешенную мерную колбу вместимостью 100 мл, взвешивают и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Концентрацию ФСО рассчитывают так же, как для ФСО парацетамола.

*Выполнение измерений.* Измерения проводят методом прямой спектрофотометрии при длине волны 273 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 0.01 М раствор кислоты хлористоводородной. Для каждого из растворов выполняют по 3 измерения с выниманием кюветы.

#### ФСО цианкобаламина (витамина В<sub>12</sub>)

*Приготовление растворов расфасованного ФСО.* Содержимое упаковки (виалы) расфасованного ФСО с известной точной навеской (около 50 мг) количественно переносят водой в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

50 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Приготовление растворов нерасфасованного ФСО.* Около 50 мг (точная навеска) ФСО

помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде (раствор А).

Далее готовят раствор, как описано для нерасфасованного ФСО.

*Выполнение измерений.* Измерения проводят методом прямой спектрофотометрии при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. Для каждого из растворов выполняют по 3 измерения с выниманием кюветы.

#### ФСО цис-изомера трамадола г/х

*Приготовление растворов расфасованного ФСО.* Содержимое упаковки (виалы) расфасованного ФСО с известным содержанием в упаковке (1 мг) количественно переносят водой в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Приготовление растворов нерасфасованного ФСО.* Около 40 мг (точная навеска) ФСО трамадола г/х помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Выполнение измерений.* По 20 мкл каждого из растворов хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ детектором, получая не менее 2 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером (150 x 4.6) мм, заполненная сорбентом LiChrosorb C18 с размером частиц 7 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор рН 1.6 (22.5:77.5), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы – 1.0 мл/мин;
- детектирование при длине волны 270 нм;
- температура колонки 30 °С.

#### *Неопределенность результатов анализа*

Для удобства расчета неопределенности результатов анализа использовали концепцию сложения квадратов доверительных интервалов [14]. Неопределенность результатов анализа для раствора рассчитывали по формуле:

$$\Delta_{\text{Met}}^2 = 1.5(\Delta_V^2 + \Delta_{\text{FAO}}^2), \quad (10)$$

где коэффициент 1.5 учитывает наличие одного раствора для нерасфасованного ФСО и двух растворов для расфасованного ФСО (процедуры пробоподготовки и конечной аналитической операции для нерасфасованного и расфасованного ФСО одинаковы). В случае цис-изомера трамадола г/х формула несколько изменяется, в связи с отсутствием



для расфасованного ФСО погрешности взвешивания.

Ниже в качестве примера приведен расчет неопределенности для ФСО парацетамола. Для других ФСО неопределенность рассчитывали аналогичным способом.

**Неопределенность операций пробоподготовки**

Для расчета неопределенности операций пробоподготовки использовали следующие значения:

Неопределенность взятия навески – 0.05 мг (весы «Sartorius MS 210 S» [17]).

Неопределенность для мерных колб [18]:  
 50 мл – 0.1 %; 100 мл – 0.08 %; 250 мл – 0.05 %; 1000 мл – 0.03 %.

Неопределенность операций пробоподготовки единичного раствора рассчитывали по формуле:

$$\Delta_V^2 = \sum \Delta_{V,i}^2, \quad (11)$$

где:  $\Delta_{V,i}$  - неопределенность для i-той операции пробоподготовки для раствора.

Для ФСО парацетамола  $\Delta_V$  рассчитывали следующим образом (указана неопределенность только для операций, дающих значимый вклад в неопределенность):

Операция	Неопределенность
Взятие навески около 50 мг	0.05 мг/50мг*100%= 0.1%
Доведение до объема 100 мл (раствор А)	0.08 %
Доведение до объема 100 мл (конечный раствор)	0.08 %
Суммарная неопределенность $\Delta_V$	0.151 %

**Неопределенность измерений**

Для уменьшения неопределенности в расчет принимают все результаты измерений, полученные при изучении неоднородности для данного СО. При этом для выражения неопределенности результатов измерений (доверительного интервала) используют объединенное число степеней свободы ( $f$ ):

$$\Delta_{FAO} = \frac{RSD_p \cdot t(f;95\%)}{\sqrt{n}}; \quad RSD_p = \sqrt{\sum_{i=1}^m (1/m) \cdot RSD_i^2};$$

$$f = m \cdot (n - 1), \quad (12)$$

где:  $RSD_i$  - относительное стандартное отклонение, в процентах, рассчитанное для результатов анализа одного из  $m$  растворов данного ФСО;

$RSD_p$  - объединенное относительное стандартное отклонение, в процентах, рассчитанное из  $RSD_i$  для всех  $m$  анализируемых растворов данного ФСО (анализируемых в одинаковых условиях);

$t$  - односторонний коэффициент Стьюдента;

$n$  - число измерений для единичного раствора данного ФСО (одинаково для всех растворов).

Поскольку в дальнейших расчетах используется среднее значение, которое может отклоняться от истинного значения или в сторону завышения, или занижения, но не первое и последнее одновременно, то в расчетах используют односторонний коэффициент Стьюдента [19].

Для того, чтобы подтвердить справедливость оценочных значений для неопределенности и проконтролировать отсутствие ошибки, сравнивали средние значения  $R_1$  и  $R_2$ , полученные для соответствующего нерасфасованного ФСО. Результаты анализа признаются качественными, если выполняется соотношение:

$$\Delta_R = 2 \cdot \frac{|R_1 - R_2|}{R_1 + R_2} \cdot 100\% \leq \sqrt{2 \cdot \left( \frac{RSD_p^2}{n} \cdot t^2(f;95\%) + \Delta_V^2 \right)}, \quad (13)$$

где:  $RSD_p$  - объединенное относительное стандартное отклонение, в процентах, рассчитанное для всех анализируемых растворов данного ФСО;

$t$  - односторонний коэффициент Стьюдента;

$f$  - объединенное число степеней свободы для всех растворов данного ФСО, проанализированных в одних условиях;

$\Delta_V$  - неопределенность операций пробоподготовки для раствора (формула 11).

Ниже приведены экспериментальные данные, полученные для ФСО парацетамола, и результаты соответствующих расчетов. Ниже приведены результаты изучения неоднородности для всех ФСО.

**Результаты и их обсуждение**

1. Для всех изученных ФСО неоднородность находится в допустимых пределах. При этом для ФСО парацетамола и кофеина неопределенность, связанная с неоднородностью ( $\Delta_{Unit}$ ), меньше неопределенности присвоения аттестованного значения ( $\Delta_{Bulk}$ ), а для цианокобаламина (витамина В<sub>12</sub>) – больше. Для данных ФСО в качестве неопределенности аттестованного значения ( $\Delta_{Att}$ ) принято наибольшее из полученных значений. Отметим,

что для ФСО цис-изомера трамадола г/х неопределенность аттестованного значения может быть оценена только из результатов изучения неоднородности.

2. Полученные результаты подтверждают предпосылку, что фармацевтические субстанции могут быть чрезвычайно однородными, и статистически значимое выделение неоднородности для них поэтому представляется сомнительным. Для всех изученных ФСО (для которых берется навеска) требования уравнения (6) не выполняются. Кроме того, неопределенность результатов измерений ( $\Delta_{\text{FAO}}$ ) меньше, чем неопределенность операций пробоподготовки ( $\Delta_{\text{V}}$ ), что затрудняет использование дисперсионного анализа для выделения неоднородности.

3. Во всех исследованных случаях погрешность методики  $\Delta_{\text{Met}}$  удовлетворяет требованию (5), т.е. позволяет подтвердить практическую незначимость неоднородности.

4. Требования к незначимости пробоподготовки в соответствии с уравнением (4) могут быть достигнуты. Однако это требует использования существенно более жестких требований к неопределенности операций пробоподготовки (взвешивание, отклонения от номинального объема для мерных колб), чем используемые при проведении фармакопейного анализа [11].

5. Для всех случаев требования к незначимости различий результатов анализа для двух растворов нерасфасованного ФСО выполняются, т.е. фактическая погрешность пробо-

Таблица 2

## Процедура изучения однородности ФСО парацетамола

Раствор	A	A <sub>cp</sub>	RSD <sub>i</sub>	RSD <sub>p</sub>	C	R	D <sub>i</sub>
1	0.605	0.6043	0.0985	0.1311	9.4E-06	64366	-0.2578
1	0.604						
1	0.604						
2	0.609	0.6101	0.1844		9.5E-06	64467	-0.1012
2	0.610						
2	0.611						
3	0.619	0.6186	0.1092		9.6E-06	64346	-0.2883
3	0.618						
3	0.618						
4	0.643	0.6423	0.1245		1E-05	64410	-0.1897
4	0.642						
4	0.642						
5	0.636	0.6358	0.0663		9.9E-06	64546	0.0216
5	0.636						
5	0.635						
нерасф. 1	0.627	0.6271	0.0723		9.7E-06	64557	
нерасф. 1	0.627						
нерасф. 1	0.627						
нерасф. 2	0.674	0.6733	0.0508		1E-05	64508	
нерасф. 2	0.673						
нерасф. 2	0.673			R:		64532	
RSD <sub>Unit</sub>	0.113						
$\Delta_{\text{Unit}}$	0.289						

A - оптическая плотность анализируемых растворов;

A<sub>cp</sub> - среднее значение оптической плотности соответствующего раствора;

RSD<sub>i</sub> - относительное стандартное отклонение для измеренных значений оптической плотности для соответствующего раствора, в процентах (формула 12);

RSD<sub>p</sub> - объединенное относительное стандартное отклонение, рассчитанное из RSD для всех растворов, в процентах;

C - концентрация соответствующего раствора, рассчитанная весовым методом (формула 9);

R - приведенное значение отклика (формула 8);

D<sub>i</sub> - относительное отклонение содержания в единице упаковки от номинального, в процентах (формула 8).

подготовки для полученных результатов не превышают оценки неопределенности. Это означает, что принятая оценка неопределенности корректна, и подтверждает корректность полученных результатов.

6. Используемая концепция сложения квадратов доверительных интервалов позволяет достаточно просто оценить значение неопределенности для результатов анализа ( $\Delta_{Met}$ ) и относительный вклад пробоподготовки ( $\Delta_V$ ) и измерений ( $\Delta_{FAO}$ ).

**Выводы**

1. Проведен критический анализ подходов и требований к изучению однородности СО.

2. Для фармацевтических СО с учетом их специфики разработан подход к изучению

однородности, а также методика ее проверки.

3. Разработанный подход был использован при аттестации ФСО ГФУ парацетамола, кофеина, цианкобаламина (витамина В<sub>12</sub>) и цис-изомера трамадола г/х.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Левин М.Г., Георгиевский В.П. Стандартизация хроматографического анализа лекарственных средств. Сообщение 3. Применение стандартов в высокоэффективной жидкостной хроматографии // Фармаком. - 1996. - № 3. - С. 12-22.
2. ISO Guide 35. Certification of reference materials – General and statistical principles, 2<sup>nd</sup> ed. - 1989. - 32 p.
3. Шаевич А.Б. Стандартные образцы для аналитических целей. – Москва: Химия, 1987. – 184 с.
4. Гризодуб А.И., Левин М.Г., Леонтьев Д.А., Вырова Е.В., Доценко Т.Н., Георгиевский В.П. Аттестация стандартных образцов. Сообщение 1. Аттестация вторичных

Таблица 3

**Результаты изучения однородности ФСО**

	ФСО ГФУ			
	парацетамола	кофеина	витамина В <sub>12</sub>	Цис-изомер трамадола г/х
Отклонения от содержания ( $X_{Att}$ ) для упаковок расфасованного ФСО, % ( $D_i$ )				
	0.0216	-0.2441	-0.3750	1.7668
	-0.1012	-0.1040	-0.1506	1.5849
	-0.1897	-0.0142	-0.0129	-0.0913
	-0.2578	0.0438	0.2165	0.7204
	-0.2883	0.1016	0.2450	-0.7179
				1.8305
				-1.0739
				1.8305
RSD <sub>Unit</sub>	0.1125	0.1212	-0.0154	1.1321
$\Delta_{Unit}$	0.2892	0.3115	0.2320	2.6717
			0.5963	
max $\Delta_{Att}$	0.5	0.8	0.6	3.16
$\Delta_{bulk}$	0.398	0.392	0.41	-
$\Delta_{FAO}$	0.131	0.082	0.079	1.047
$\Delta^V$	0.151	0.151	0.158	0.129
$\Delta_{Met}$	0.283	0.243	0.250	
$\Delta_R$	0.0767	0.0173	0.127	
требования к $\Delta_R$	0.256	0.231	0.240	

RSD<sub>Unit</sub> - относительное стандартное отклонение для содержаний в упаковке (уравнение 7);

$\Delta_{Unit}$  - относительный доверительный интервал для разброса единичных содержаний основного вещества в упаковках СО вокруг номинального значения  $X_{Att}$  (уравнение 7);

max  $\Delta_{Att}$  - требования к неопределенности аттестованного значения ФСО (формула 1);

$\Delta_{bulk}$  - фактическое значение для неопределенности аттестованного значения для нерасфасованного ФСО (формула 1);

$\Delta_{FAO}$  - неопределенность конечной аналитической операции (формула 12);

$\Delta^V$  - неопределенность пробоподготовки для раствора, в процентах (формула 11);

$\Delta_{Met}$  - неопределенность результатов анализа (формула 10);

$\Delta_R$  - фактическое различие результатов анализа для двух растворов нерасфасованного ФСО (уравнение 13, левая часть);

$\Delta_R$  - требования к максимально допустимому различию результатов анализа для двух растворов нерасфасованного ФСО (уравнение 13, правая часть).

стандартних образцов для количественного хроматографического анализа лекарственных средств // Фармаком. — 1999. - № 2. - С. 46-51.

5. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г., Доценко Т.Н. Аттестация стандартных образцов для спектрофотометрического анализа лекарственных средств // Физиологично активні речовини. — 2000. - № 2 (30). - С. 38-44.

6. ГОСТ 8.531-85. Однородность стандартных образцов состава дисперсных материалов. Методика выполнения измерений. - М.: Издательство стандартов, 1985. - 9 с.

7. ОМУ 64-102-85. Оценка однородности материала стандартных образцов лекарственных веществ. Общие требования. - М.: Министерство медицинской промышленности, 1985. - 13 с.

8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - 556 с.

9. Леонтьев Д.А. До питання створення системи фармацевтичних стандартних зразків в Україні // Фармацевтичний журнал - 2001. - № 5. - С. 28-37.

10. ДСТУ 3232-95. Стандартні зразки. Основні положення, порядок розроблення, атестації, затвердження, реєстрації і застосування. — Київ: Держстандарт України, 1996. - 39 с.

11. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 3<sup>rd</sup> ed. // Pharmeuropa. - 1999. - December. - 88 p.

12. ISO Guide 34:2000(E). General requirements for the competence of reference material producers. - 2000. - 22 p.

13. Chemical Reference Substances. Catalogue. - EDQM. European Pharmacopoeia ([www.pheur.org](http://www.pheur.org)).

14. Дозрфель К. Статистика в аналитической химии. Пер. с нем. — М.: Мир, 1994. — 268 с.

15. Шенк Х. Теория инженерного эксперимента. Перевод с английского. Под редакцией Н.П. Бусленко. — Москва: Мир, 1972. — 381 с.

16. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Физиологично активні речовини. — 2001. - № 1 (31) - С. 32-44.

17. Microelectronics Weighing Instruments. Accuracy Class 1. Analytical, Semi-micro- and Macrobalsances. Installation and Operating Instructions. - Sartorius. - 98648-004-13.

18. [http://www.voiigtglobal.com/volumetric\\_flasks.htm](http://www.voiigtglobal.com/volumetric_flasks.htm) (02. 2002).

19. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Content limits in the European Pharmacopoeia // Pharmeuropa. - 1997. - V.9, № 1. - P. 137-153, 148-156.

#### Резюме

Леонтьев Д.А., Гризодуб О.И., Левин М.Г., Доценко Т.М.

#### Аттестация фармацевтичных стандартных зразків: вивчення однорідності

У рамках створення національної системи стандартних зразків (СЗ) лікарських засобів (ЛЗ) розглянуті питання контролю однорідності вмісту цільової речовини в різних упаковках СЗ. Представлений критичний

аналіз стану цього питання в різних вітчизняних і міжнародних настановах і показано, що останні мало застосовні до фармацевтичних СЗ, оскільки не враховують специфіку ЛЗ і методів їх контролю. Запропонований підхід до контролю однорідності вмісту фармацевтичних СЗ, що враховує цю специфіку.

#### Summary

Leontyev D.A., Grysodub A.I., Levin M.G., Dotsenko T.N.

#### Certification of pharmaceutical reference standards: uniformity study

In the network of creation of national system of medicinal agents (MA) reference standards (RS) the issues of uniformity control of target substance in various RS packings were considered. The critical analysis of this issue state in the various domestic and international guidelines is given; it was shown that the latter ones are scarcely applicable to pharmaceutical RS since they don't take into account the specific character of MA and control methods of ones. The approach to control of pharmaceutical RS uniformity considering this specificity is proposed.

**Леонтьев Дмитрий Анатольевич** (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Работает в лаборатории хроматографии ГНЦЛС (с 1993). Ст. науч. сотрудник. Руководитель группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». Канд. фарм. наук (1997).

**Гризодуб Александр Иванович.** Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992). Канд. хим. наук (1982). Доктор хим. наук (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации аналитических химиков. (1997).

**Левин Михаил Григорьевич** (р. 1957). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1979). Работает в ГНЦЛС (с 1979). Ведущий науч. сотрудник лаборатории хроматографии ГНЦЛС. Доктор хим. наук (1993). Зав. отделом ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». Действительный член Британского Химического Королевского Общества.

**Доценко Татьяна Николаевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1997). Работает в отделе ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». Мл. науч. сотрудник группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология».

УДК 615.2/3

Фетисова Е.Г.

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

## Специализированная информационная система «Офто» – источник информации в повседневной работе

Обоснована актуальность создания специализированных персональных информационных систем, которые могут быть использованы в повседневной исследовательской работе. Создана специализированная информационная система «Офто», позволяющая хранить и проводить оперативный поиск информации, относящейся к области препаратов для офтальмологии и оторинологии. Приведена структура и возможности данной системы.

Одним из важнейших этапов научной деятельности является работа с литературой. Это трудоемкий процесс, занимающий большое количество времени и требующий создания условий для хранения информации.

В настоящее время существует несколько способов хранения данных. Одним из наиболее распространенных является создание каталога. На этом принципе построена информация о литературе, хранящаяся в библиотеках. Однако, этот способ имеет свои недостатки. Во-первых, поиск необходимой информации занимает немало времени. Во-вторых, одна и та же информационная единица может относиться к различным направлениям, и будет повторяться в зависимости от количества направлений, к которым она относится. Это повторение ведет к значительному увеличению объема картотеки.

Другим, более современным способом является разработка информационных систем. Использование компьютера и разработка таких информационных систем, как базы данных, позволили в сотни тысяч раз увеличить возможности исследователя при работе с информацией. Персональные компьютеры рекомендовали себя удобным средством для поддержания относительно небольших баз данных индивидуального пользования. База данных – большое по объему хранилище, в которое помещают все необходимые данные, и из которого пользователи могут их получить в том виде, в каком они нужны для конкретной задачи, независимо от способа хранения, и тратить на это минимум времени, а также избежать многократного дублирования.

В последние годы большую популярность приобрела система Internet. Сейчас в Internet работает более 100 стран, существует более 50 тысяч отдельных сетей, зарегистрировано более 30 млн пользователей [4]. Что касается фармации, то найти необходимую информа-

цию здесь могут специалисты разных профессий, поскольку существует немало информационных серверов, баз данных, Web-сайтов, ориентированных на разработчиков лекарственных средств, фармакологов, клиницистов, врачей, провизоров и т.д. Однако, несмотря на широкие возможности, у данной системы существует целый ряд недостатков. Во-первых, для того чтобы сориентироваться в потоке информации и найти необходимую, требуется высокий уровень поисковой квалификации. Во-вторых, получение специализированной информации, в основном, осуществляется за плату. В-третьих, основная масса данных постоянно обновляется, и если сразу их не записать, то нет гарантии, что эти данные найдутся в следующий раз. Поэтому даже если удастся найти и получить необходимую информацию, возникает вопрос о ее хранении.

Роль базы данных в современном мире трудно переоценить. Все, с чем мы имеем дело в повседневной работе, скорее всего, уже учтено и зарегистрировано в какой-то базе. В настоящее время в мире разработано большое количество банков данных и по лекарственным средствам. Только в сборнике тезисов докладов к VI Российскому национальному конгрессу «Человек и лекарство» представлено около 30 тезисов, описывающих различные базы данных по медицине и фармации [5]. Большинство информационных систем по лекарственным средствам содержит огромное количество препаратов, относящихся к различным терапевтическим группам, и малое количество информации об этих препаратах. Во многих из них данные классифицированы только по фармакологическим группам, основным действующим веществам и производителям. Это не всегда удобно для исследователя, работающего в узкой области, поскольку такие базы данных, с одной стороны, содержат много лишней ин-

формации, а с другой - не в состоянии предоставить необходимую. Например, невозможно сделать выборку препаратов по лекарственной форме или по виду упаковки. Поэтому для решения конкретной задачи приходится обращаться к дополнительным информационным источникам и тратить дополнительное время.

В лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм, как и в каждом научном подразделении, систематически ведется работа с научной литературой. За время работы накопилось значительное количество информации, касающейся исследований в области химии, технологии, фармакологии, упаковки готовых лекарственных средств для офтальмологии и оторинологии. В результате возникла потребность классификации и хранения полученных данных. Используя существующие в настоящее время средства хранения информации, а также учитывая собственные возможности, была разработана специализированная информационная система (СИС), соответствующая целям и задачам лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм.

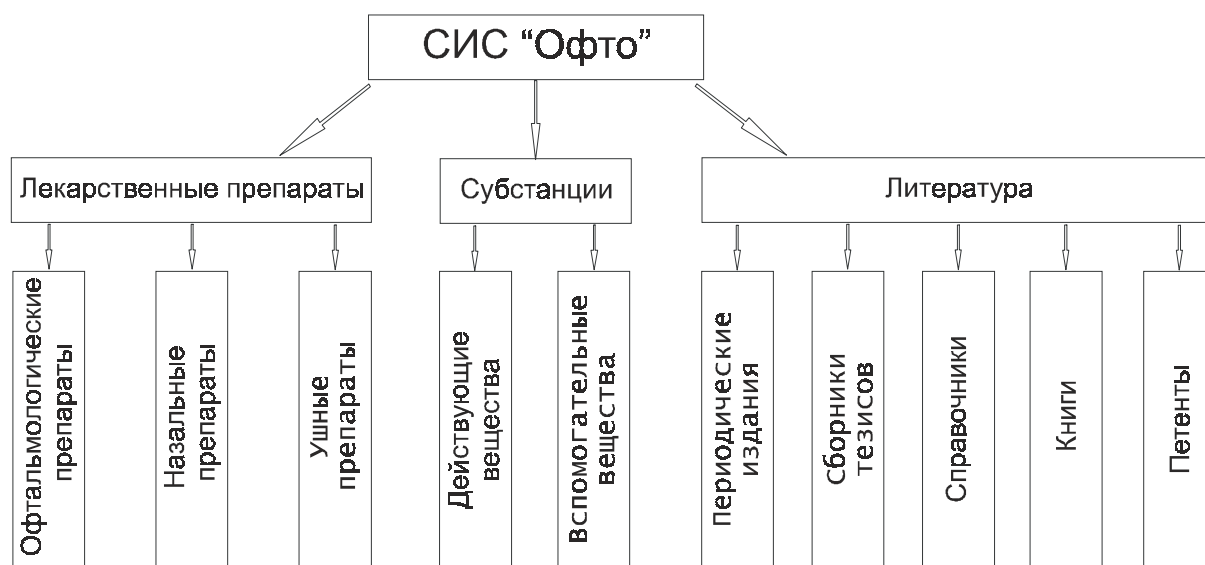
Для СИС было использовано Windows-приложение Microsoft Access 97, которое входит в состав пакета Microsoft Office. Основное назначение этой системы управления базами данных (СУБД) — дать пользователю простое и доступное средство, которое позволит ему создавать на рабочем месте необходимые персональные информационные сис-

темы, используемые в повседневной работе. При этом практически не возникает необходимости что-либо программировать, так как этой программой может пользоваться каждый. Несмотря на простоту, Access позволяет создавать базы данных достаточно сложной структуры, а в случае необходимости их мощность можно увеличить применением программирования. Главное достоинство данной СУБД, привлекающее пользователей, состоит в том, что это приложение интегрировано с другими приложениями Microsoft Office [1-3].

В основу информационной системы легли данные, имеющиеся в отечественной и зарубежной научной литературе и справочниках, включающие сведения о готовых препаратах для офтальмологии и оторинологии, а также материалы, содержащие информацию о различных разработках и исследованиях, проводимых в области создания таких препаратов.

В результате анализа информационных ресурсов была выбрана следующая структура СИС, представленная в виде схемы (Рис. 1). Разработанная база данных «Офто» содержит 3 раздела, которые работают как единое целое и в то же время являются самостоятельными информационными системами. Это: «Лекарственные препараты», «Субстанции» и «Литература». Структура информационной системы содержит 4 главных и 37 подчиненных взаимосвязанных между собой таблиц. На Рис. 2 и Рис. 3 представлены ос-

Рисунок 1



Структура специализированной информационной системы

Рисунок 2

Таблица "Лекарственные препараты"

№	Препарат	Форма	Производитель	Форма упаковки	Материал упаковки	Объем упаковки	Размер
227	"Physiologica" serum physiologique	Раствор	Gifrer-Barbezat	Флакон	Стекло	5	мл
225	Actovegil (Актовигил)	Гель	Nycomed Austria	Туба	Не известно	5	г
115	Acyclovir BMS (Ацикловир БМС)	Мазь	Gea Farmaceutisk Fabrik	Туба	Не известно	4.5	г
181	Afrin (Африн)	Раствор	Schering Plough Central East AG	Флакон	Не известно	20	мл
182	Afrin (Африн)	Капли	Schering Plough Central East AG	Флакон-дозатор	Полимер	10	мл
234	Alcaine (Алкаин)	Капли	Alcon Pharmaceuticals Ltd.	Флакон	Не известно	15	мл
209	Allergodil (Аллергодил)	Капли	Asta Medica AG	Флакон	Не известно	6	мл
208	Allergodil (Аллергодил)	Спрей	Asta Medica AG	Флакон	Не известно	10	мл
259	Atropini sulfas (Атропина сульфат)	Капли	ОЗ ГНЦЛС	Флакон	Стекло, резина	5	мл
186	Atropini sulfas (Атропина сульфат)	Раствор	Московский эндокринный завод"	Флакон	Стекло, резина	5	мл
151	Aurisan (Арусан)	Капли	ОЗ ГНЦЛС	Флакон - капельница	Стекло, полимер	5	мл
78	Berberil (Берберил)	Капли	Bausch & Lomb, Doctor Mann Pharma	Флакон-капельница	Полимер	10	мл
79	Berberil (Берберил)	Капли	Bausch & Lomb, Doctor Mann Pharma	Тюбик - капельница	Полимер	0.5	г
39	Betadrin (Бетадрин)	Капли	Polfa	Флакон	Полиэтилен	10	мл
37	Betoptic (Бетоптик)	Капли	Alcon Pharmaceuticals Ltd.	Флакон-капельница	Полимер	5	мл
128	Betoptic S (Бетоптик С)	Суспензия	Alcon Pharmaceuticals Ltd.	Флакон-капельница	Полимер	5	мл

новые таблицы раздела «Лекарственные препараты» и «Литература».

В качестве единичных объектов были выбраны:

- лекарственный препарат для раздела «Лекарственные препараты» - готовое лекарственное средство для офтальмологии и оторинологии, выпускаемое конкретной фирмой-производителем и имеющее собственное торговое название;

- информационная единица для раздела «Литература» - тезисы, статьи из научных журналов, справочной и научной литературы, патенты;

- химическое вещество для раздела «Субстанции» - вещество с конкретным названием, формулой и свойствами, входящее в состав лекарственного препарата в качестве основного действующего вещества либо вспомогательного вещества.

Для каждого единичного объекта разделов «Лекарственные препараты» и «Литература» характерны как общие, так и индивидуальные свойства.

К общим свойствам относятся: назначение, лекарственная форма, действующее вещество, вспомогательные вещества, вид, ма-

териал и объем упаковки, фармакологическая группа, источник информации, дополнительная информация (рН, осмолярность, вязкость, срок годности, условия хранения и т.п.).

Индивидуальными свойствами являются:

- для лекарственного препарата: название препарата на русском, английском или латинском языках; фирма-производитель; показания к применению; регистрация в Украине;

- для информационной единицы: полное описание литературной ссылки с указанием источника информации, типа источника (книга, журнал, тезис, патент), названия источника, номера источника (для журнала), года выпуска, списка авторов, язык, на котором предоставлена данная информация и резюме.

Кроме того, для удобства выбора данных каждая информационная единица отнесена к одному из таких разделов, как химия, технология или фармакология, либо к их комбинации.

В раздел «Субстанции» предполагается включение максимально полного описания действующих лекарственных веществ, а также всех классов ингредиентов, традиционно

Рисунок 3

Таблица "Статьи"

№	Журнал	Год	№ журнала	Название статьи	Автор	Резюме	Химия	Фармакология	Технология	Стр/Яз.
2	Фармация	1988	4	Исследование стабильности глазных капель сульфацил натрия	Бессонова Н.И., Карчевская В.В., Мухина Т.Ю.	Примечание: срок хранения 1 мес.	Нет	Нет	Да	С.73-75.
3	Farm.Pol	1988	3	Стабильность глазных капель с гентамицина сульфатом в зависимости от способа приготовления и условий хранения.	Rybicka Alicja, Zakrrewski Zdzislaw, Marchlewska Barbara	Исследование влияния способа приготовления глазных капель и условий хранения на биологическую активность. В качестве наилучшего растворителя для 0.1-1% препаратов предложен фосфатный буферный раствор следующего состава (в ч.): натрия фосфорнокислого однозамещенного двухводного 0.4, натрия фосфорнокислого двузамещенного безводного 0.6, натрия хлорида 0.3, дистиллированной воды до 100 мл. Срок хранения при t 25° – 1 месяц.	Нет	Нет	Да	С. 134-136 (пол., рез. англ.)
4	Farm.obz	1988	5	Высвобождение составных частей упаковок из пластмасс в растворе.	Rybicka Alicja, Zakrrewski Zdzislaw, Marchlewska Barbara	В обзоре приведены данные научной литературы о высвобождении составных частей упаковок из поливинилхлорида в растворы, хранящиеся в этих упаковках. Приведены результаты оценки растворов для в/в – 5% раствор глюкозы и 0.9% раствор натрия хлорида. Результаты анализа воды для инъекций показали наличие пластификатора ди(2-этилгексил)фталата, составных частей ионного характера (ионы калия, натрия, цинка, кальция, магния, хлора), восстановителей, нелетучих веществ и изменения pH.	Да	Нет	Нет	С.203-209. словацк.
9	Химико-фармацевтический журнал	1985	12	Диффузия фурацилина, преднизолона и модельных органических ионов в гидрогелях для мягких контактных линз.	Стародубцев С.Г., Рябина В.Р., Демяшечевич А.С., Кирш Ю.Ф., Павлова Н.Р.	Скорость диффузии в гелях определяется их влагосодержанием и химической природой. Найдено, что коэффициент диффузии исследуемых веществ и их константы распределения гель/вода коррелируют между собой. Изучена кинетика выделения преднизолона из мягких контактных линз продолжительного ношения, даны практические рекомендации применения мягких контактных линз с терапевтической целью.	Да	Нет	Нет	С. 1468-1472
12	Химико-фармацевтический журнал	1989	5	Применение хитина и его производных в фармации (обзор).	Дубинская А.М., Добротворский А.Е.	Применяется в качестве глазных пленок с пилокарпином.	Да	Нет	Нет	С. 623-628. Рус.
13	Химико-фармацевтический журнал	1989	3	Водные растворы олигомеров на основе окиси этилена (обзор).	Топчиева И.Н.	Рассмотрены свойства полиэтиленгликолей и проксанолов (плюроники).	Нет	Нет	Нет	С. 261-267.- Рус.

входящих в состав отечественных и зарубежных лекарственных средств для офтальмологии и оториноларингологии. В данном случае лекарственное вещество, с одной стороны, рассматривается как единичный объект и характеризуется определенным набором свойств, а с другой стороны, как свойство, которое

описывает лекарственный препарат и информационную единицу.

Для описания лекарственного вещества как единичного объекта выбран следующий набор свойств: полное химическое название, синонимы, структурная формула, физико-химические и фармакологические свойства. К этому же набору для описания вспомога-



Рисунок 4

Результат запроса, представленный в виде таблицы, на выбор патентов, относящихся к лечению определенного заболевания

Название патента	Источник	Страна	Резюме	Заболевание
Препарат для лечения катаракты (1)	РЖХ 1988 г. 200193 П.	Германия	Предлагается препарат для лечения катаракты, где в качестве активных ингредиентов используют аминокислоту, которая в своей структуре содержит атом серы, ее производное, основание Шиффа, S-метил- $\alpha$ -кетомасляную кислоту (I), гомосерин и производное гидроксibenзиловой кислоты. Пример состава глазных капель: 10 ммоль I, 0.018 г натрия фосфорнокислого однозамещенного одноводного, 0.190 г натрия фосфорнокислого двузамещенного двухводного, 0.100 г глицерина, и/или декстрана и стерильной дистиллированной воды до 100 мл. Есть результаты испытаний на кроликах.	Катаракта
Препараты для лечения последствий диабета	РЖХ 1989 г. 120299 П.	Япония	Для профилактики и лечения диабетической катаракты, ретинопатий, нефропатий, невритов и т.п. предложены препараты с активным веществом (приведена формула), участвующие в реакциях ОК сп., альдегидов. глюкозы или аминов в организме и обладающих витаминоподобной активностью. Приведена рецептура препаратов.	Катаракта
Препарат для лечения катаракты	РЖХ 1989 г. 170207 П.	Япония	Для лечения старческой, диабетической и др. видов катаракты предложены фарм. препараты, нормализующие уровень кальция в хрусталике и предотвращающие его помутнение, содержащие в качестве активных ингредиентов активный витамин Д (1 $\alpha$ -гидроксивитамин Д, 1 $\alpha$ ,2,4-дигидроксивитамин Д и др.), эффективный в дозах 0.01-10 мкг 1-3 раза в сутки	Катаракта старческая

тельных веществ добавлено практическое назначение данного вспомогательного вещества в составах препаратов.

Основная часть вышеперечисленных свойств описана в индивидуальных таблицах, которые содержат конкретный перечень возможных категорий данного свойства. Например, основное назначение лекарственного средства включает глазные лекарственные средства, ушные лекарственные средства, назальные лекарственные средства и т.д. Такие свойства, как основное действующее вещество, вспомогательные вещества, источники информации, содержат произвольный список, который можно пополнять новой информацией или убирать уже не интересующую пользователя. Также существуют свойства, которые не имеют индивидуальных таблиц, а находятся в главных таблицах. К таким свойствам относятся рН, номер журнала, год выпуска источника информации (данные характеристики описываются при помощи числового типа данных), физико-химические и фармакологические свойства, синонимы, дополнительная информация (данные характеристики описываются при помощи таких типов данных, как текстовый или поле Мемо).

Как уже упоминалось ранее, основное отличие базы данных от традиционных бумажных носителей заключается в том, что СУБД позволяет не только хранить информацию с учетом различных классификаций, но и производить быстрый поиск информации по

конкретно интересующему вопросу, затрачивая на это минимум усилий. Основным элементом базы данных является поисковая система, посредством которой можно получить информацию из всех разделов и таблиц. Разработанная база данных позволяет решать вопросы выбора препаратов, лекарственных средств и информационных данных по всем вышеперечисленным свойствам. Выборку необходимой информации можно производить как по индивидуальному свойству, так и по любой комбинации данных свойств. Комбинация может содержать все свойства, характерные для данного единичного объекта. Набор свойств, по которым необходимо провести поиск, зависит от конкретной задачи. Был разработан перечень типичных задач, наиболее часто возникающих перед исследователями, и на его основе созданы запросы. На Рис. 4 приведен пример такого запроса, показывающий выборку патентов, в которых описаны препараты для лечения катаракты. Для удобства ввода и просмотра данных были созданы формы, что позволило стилизовать информацию необходимым образом и сделать ее наглядной. Результаты поиска можно просматривать в виде таблиц или форм, а также распечатывать в виде отчета. Пример такого отчета представлен на Рис. 5. Поскольку в информационной системе лекарственные препараты классифицированы по фирмам-производителям с указанием страны и по источникам информации, которые описы-

Рисунок 5

## Поиск препаратов и действующих веществ по фармакологической группе

Название препарата	Название действующего вещества
Allergodil (Аллергодил)	Азеластин гидрохлорид
Alomid (Аломид)	Лодоксамид трометамин
Betadrin (Бетадрин)	Нафазолин нитрат
	Борная кислота
	Димедрол
Cromoglin (Кромоглин)	Кромогликат натрия
Cromohexal (Кромогексал)	Кромогликат натрия
Diabetyl (Диабенил)	Тетризолина гидрохлорид
Hay-Crom (Хай-Кром)	Кромогликат натрия
Histimet (Гистимед)	Левакабастин

## Результат запроса, представленный в виде отчета, на выбор препаратов, относящихся к определенной фармакологической группе

вают регистрации препаратов в конкретной стране, "Офто" позволяет решать вопросы анализа отечественного и зарубежного рынков. База данных снабжена большим объемом фактического материала по существующим отечественным и зарубежным разработкам и исследованиям в офтальмологии и оторинологии, что позволяет проводить обзоры литературы по различным направлениям, касающимся данной области.

**Выводы**

1. Проведен анализ и структурирование информации о лекарственных препаратах, лекарственных веществах, научно-исследовательских разработках в области офтальмологии и оторинологии, полученной из научной литературы, периодических изданий и справочников о готовых лекарственных средствах.

2. В качестве системы управления базами данных выбрано широко распространенное W-приложение MS Access 97 и на его основе, применительно к офтальмологии и оторинологии, создана специализированная персональная информационная система «Офто», позволяющая структурировать по общим и индивидуальным свойствам вышеописанную информацию, проводить быстрый поиск и выборку необходимых данных.

3. База данных «Офто» может служить моделью для создания подобных систем в различных областях фармации и медицины.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Палмер С. Access 2 для «чайников». - К.: «Диалектика», 1995. - 256.
2. Ахаян Р., Горев А., Макашарипов С. Эффективная работа с СУБД. - С.-П.: «Питер Пресс», 1997. - 704 с.
3. Новейший самоучитель работы на компьютере / Под ред. С. Симоновича. - М.: «Десс», 1999. - 656 с.
4. Чубенко А.В., Васильев А.В., Лабушевская Л.Д. Поиск информации по фармакологии и фармации в Интернете и профессиональных информационных системах // Провизор. - 2000. - № 4. - С. 10-11.
5. VI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», Москва 10-14 апреля 2000: Тез. докл. - М., 2000. - 543 с.

**Резюме**

Фетисова О.Г.

**Спеціалізована інформаційна система "Офто" – джерело інформації у повсякденній роботі**

Обґрунтована необхідність створення спеціалізованих персональних інформаційних систем, що можуть бути використані в повсякденній дослідній роботі. Створена спеціалізована інформаційна система "Офто", яка дозволяє зберігати і проводити оперативний пошук інформації, що відноситься до галузі препаратів для офтальмології та оторинології. Наведена структура і можливості даної системи.

**Summary**

E.G. Fetisova

**Specialized information system «Ophtho» - information source in everyday work**

Necessity for the development of specialized personal information systems to be used in everyday research work has been substantiated. The specialized information system «Ophtho» enabling to carry out an operative search of information concerning the area of drugs for ophthalmology and otorhinology, has been designed. The system structure and possibilities have been demonstrated.

**Фетисова Елена Геннадиевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1995). Мл. науч. сотрудник лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных средств ГНЦЛС.

## Фітохімічні дослідження

УДК 615.32:579:615.012

Литвиненко В.И., Мартынов А.В., Попова Н.В., Кожух И.А.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков  
Национальная фармацевтическая академия Украины  
Институт микробиологии им. И.И. Мечникова

### Некоторые технологические и биофармацевтические особенности экстракции лектинов бадана

Проведено исследование корреляции между технологией получения экстрактов из листьев бадана толстолистного и фармакологической активностью. Впервые определено, что противовирусная активность экстрактов обусловлена лектинами и зависит от технологии получения экстрактов. С увеличением концентрации спирта этилового и повышением температуры уменьшается противовирусная активность в отношении вируса герпеса. Установлена наименьшая эффективная концентрация суммы лектинов в пересчете на сухое сырье – листья бадана толстолистного.

Основной причиной привыкания клеток, инфицированных вирусами, и раковых клеток к низкомолекулярным противовирусным лекарственным средствами является амплификация гена *gas* [1,2,3], который кодирует гликопротеидный мембранный насос и носит название гликопротеид Р. Благодаря этому гликопротеиду все низкомолекулярные препараты сразу высвобождаются из клеток [4]. Размеры гликопротеида Р не дают возможности проникнуть через мембрану белкам и полисахаридам как в виде липосомальных композиций, так и в нативном состоянии. Это позволяет предполагать подавление эффекта лекарственной устойчивости клеток при лечении высокомолекулярными лизирующими агентами. К таким агентам можно отнести группу галактозоспецифичных лектинов-ингибиторов фактора элонгации РНК на рибосомах [5] и группу основных полисахаридов группы хитозана (лектины имеют фрагмент хитозана в структуре) [6,7,8].

Среди таких высокомолекулярных веществ нами был выбраны лектины бадана, выделенные из листьев бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia*, сем. *Saxifragaceae*) [9].

Важным моментом в разработке высокоэффективных противовирусных средств является оптимальная технологии получения БАВ, которая не должна приводить к утрате биологической активности этих соединений. Предполагая, что лектины из листьев бадана толстолистного могут отвечать за противовирусную активность экстракта; биологическое действие экстракта бадана будет зависеть от наличия в составе экстракта суммарной фракции активных и не денатурированных лектинов.

Целью нашей работы является установление корреляции между методом получения экстракта и активностью лектинов в зависимости от методов экстракции и очистки полученных экстрактов.

Для подтверждения того, что действующими веществами являются лектины, нами были взяты для исследования две основные фракции: свободная от белков и полисахаридов и белково-полисахаридная. Они были исследованы на предмет проявления противовирусной активности *in vitro*. Все экстракты проверяли на наличие лектинов с помощью реакции агглютинации эритроцитов [10].

Водный экстракт, полученный из листьев бадана толстолистного вакуум-фильтрационным методом при комнатной температуре, использовали для выделения лектинов с помощью аффинной хроматографии на Ig-G сефарозе [11]. Содержание лектинов в растворе контролировали с помощью теста агглютинации [10].

#### Материалы и методы

В исследованиях использовали Ig-G против антител человека фирмы «Вектор», сефарозу фирмы «Merck», буферные растворы и галактозу фирмы «Sigma», хроматографическую колонку «Chroma +» с УФ-детектором. Все реактивы и оборудование были предоставлены фирмой «Синбиас» (г. Донецк) и ГП «Завод химических реактивов» НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины (г. Харьков). В исследованиях противовирусного действия лектинов и исследуемых препаратов использовали: культуру клеток почек обезьяны (VERO) из ИЕКВМ, предоставленную зав. лабораторией индикации канд. вет. наук,

ст. науч. сотрудником Бабкиным М.В., штамм Л-2 вируса герпеса 1 типа (ВПГ1) (предоставленный проф. Высиканцевым И.П. ИПКиК НАН Украины (г. Харьков); набор фильтров и фильтровальную установку фирмы «Владипор» для фильтрационной стерилизации лектинов, питательную среду 199 ЦНИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (г. Москва). Для изучения биологической активности исследовали следующие экстракты: экстракт из листьев бадана (ВВ), полученный методом холодной экстракции, экстракт из листьев бадана, полученный методом горячей экстракции (ВГ), 40 % спиртовой экстракт из листьев бадана (ВС) и экстракт из листьев бадана, свободный от белков и полисахаридов (ВЕ), а также полученную фракцию лектинов (Ф1-Ф16). Далее из экстракта (ВВ) выделяли лектины по методике [10]. Агглютинацию эритроцитов барана под влиянием лектинов изучали таким образом: 0.05 мл полученного экстракта смешивали с 0.1 мл 0.9 % раствора натрия хлорида и 0.05 мл отмытых эритроцитов в лунках колбы Вюрца которую встряхивали и оставляли до оседания эритроцитов. В контрольную лунку помещали 0.15 мл 0.9 % раствора натрия хлорида и 0.05 мл эритроцитов, встряхивали и оставляли до оседания эритроцитов. Фиксировали наличие агглютинатов на дне лунок.

**Получение экстракта ВВ.** Тонко измельченное сырье (частицы размером 1-2 мм) экстрагировали водой дистиллированной (1:5) вакуум-фильтрационным методом в течение 1.5 ч. Сырье загружали в емкость и заливали экстрагентом до полной пропитки. Затем пропитавшееся сырье заливали экстрагентом до получения зеркального слоя и настаивали в течение 15-20 мин. Полученную порцию экстракта сливали, а сырье загружали следующей порцией экстрагента. Экстракцию продолжали до получения экстракта в соотношении 1:5. Экстракт упаривали под вакуумом. Далее полученный сухой экстракт растворяли в 0.9 % растворе хлорида натрия и исследовали на агглютинирующую активность. Экстракт пропускали через колонку с Ig-G-сефарозой для выделения чистой фракции лектинов, которую вымывали из колонки смесью 35 % галактозы и 2 % лактозы. Полученные лектины переосаждали для изучения противовирусных свойств. Концентрацию белка устанавливали спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

**Приготовление экстракта ВГ.** Экстракт получали методом горячей экстракции водой на водяной бане при температуре (85-90) °С. Затем экстракт концентрировали под вакуумом. Полученный сухой экстракт растворяли в 0.9 % растворе хлорида натрия и исследовали на агглютинирующую активность.

**Получение экстракта ВС.** Экстракт готовили методом вакуум-фильтрационной экстракции (1:5), аналогично ВВ. В качестве экстрагента использовали 40 % спирт этиловый. Далее экстракт исследовали на агглютинирующую активность.

**Фракция ВЕ.** Сырье экстрагировали водой методом исчерпывающей экстракции в течение 1.5 ч без нагревания, порциями. Полученный экстракт фильтровали и далее по каплям добавляли холодный (температура - 20 °С) 96 % спирт этиловый при постоянном перемешивании. Через 3 ч центрифугировали, жидкость сливали, а к осадку прибавляли 0.9 % раствор натрия хлорида, перемешивали и фильтровали. Полученную таким образом фракцию исследовали на агглютинирующую активность.

**Фракции 10-16.** Проводили те же процедуры, что и для ВЕ, но осаждали белково-полисахаридную фракцию спиртом при комнатной температуре.

Содержание белка в экстракте ВВ определяли по методу Фоля [12].

Противовирусную активность фракции ВЕ и суммы лектинов исследовали на культуре клеток VERO, которая была инфицирована вирусом герпеса 1 типа штамм Л-2 с титром 7.0 иммуноглобулина. Исследование проводили согласно методике [13]. Методика исследования основывается на торможении цитопатической активности действия вируса исследуемыми препаратами в активной концентрации после установления их минимальной переносимой концентрации (МПК). Исследование проводили с клетками в семи пробирках на каждый экстракт, три пробирки использовали как контроль вируса (без препарата) и три пробирки — как контроль культуры (без вируса). Конечная концентрация составила 1.5 мкг/мл.

### *Результаты и обсуждение*

Было установлено, что на активность лектинов влияют продолжительность и температура экстракции сырья. Кратковременная (1-5 мин) экстракция водой измельченного сырья как при комнатной, так и при температуре кипящей водяной бани, не приводят

к денатурации лектинов. Хотя длительная экстракция (до 1.5 ч при температуре 100 °С) приводит к утрате экстрактом способности к агглютинации эритроцитов.

Содержание белка в экстракте ВВ, определенное по методу Фоля, составило 62.04 %.

Титр лектинов бадана в экстракте ВВ составил 1:1024.

Экстракты, полученные вакуум-фильтрационным методом, характеризуются следующими технологическими параметрами (Таблица).

Установлено, что концентрация спирта этилового (Рис. 1) более 65 % в растворе приводит к необратимой денатурации лектинов (НДЛ), а минимальная концентрация спирта этилового, при которой осаждаются лектины, составляет 38 %. Установлено, что вакуум-фильтрационная экстракция 0.9 % раствором натрия хлорида очищенного сырья приводит к получению экстракта, который не теряет агглютинирующей активности к эритроцитам.

Таким образом, максимальная концентрация спирта этилового в экстракте не должна превышать 38 %.

Таблица

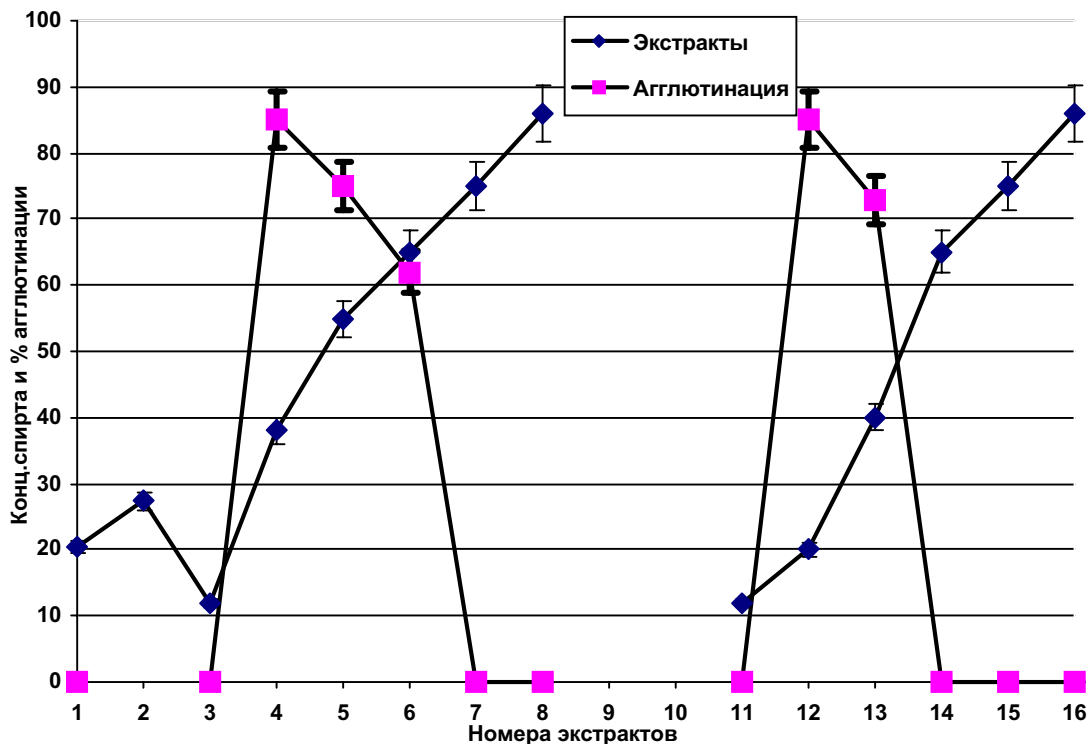
**Характеристика экстрактов листьев бадана толстолистного**

Вид экстракта	Экстрагент	Температура получения экстракта	Агглютинирующая активность полученных экстрактов	Содержание экстрактивных веществ
ВВ	Вода, 0.9 % NaCl	20 °С	+	25.37 %
ВГ	Вода, 0.9 % NaCl	(85-90) °С	-	20.98 %
ВС	40 % спирт этиловый	20 °С	-	19.00 %
ВЕ	Вода, 96 % спирт этиловый	-20 °С	-	16.08 %

Результаты исследования противовирусного действия экстрактов ВЕ и суммы лектинов из фракции ВВ представлены на Рис. 2. Минимальная эффективная доза суммы лектинов установлена на уровне 0.15 мкг/мл методом десятичных разведений.

Как видно из Рис. 2, влияние лектинов бадана на цитопатическое действие (ЦПД) вируса герпеса в концентрации 15 мкг/мл и

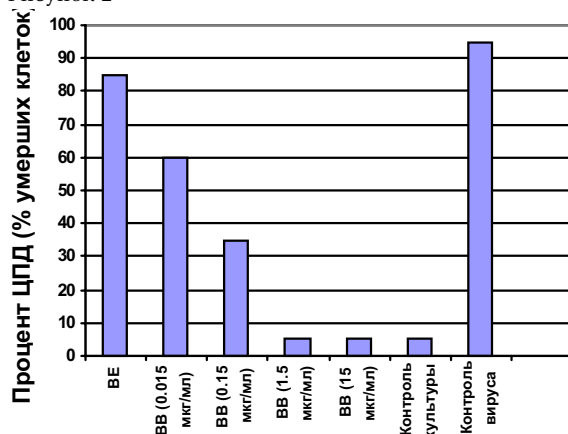
Рисунок 1



**Зависимость между концентрацией спирта этилового в экстракте и агглютинирующими свойствами экстрактов**

0.15 мкг/мл фактически не отличается от контроля неинфицированной культуры, тогда как экстракт, свободный от лектинов, не имеет противовирусных свойств. Наименьшая эффективная концентрация суммы лектинов в пересчете на сухое сырье составляет 1.5 мкг/мл.

Рисунок 2



#### Противовирусное действие лектинов бадана из экстракта ВВ и свободной от белков и полисахаридов фракции ВЕ

#### Выводы

1. Активность экстракта из листьев бадана зависит от способа получения и наличия в нем лектинов. Недопустимо использовать спирт этиловый для осаждения лектинов или высокую температуру, так как это приводит к денатурации белков и потере противовирусной активности.

2. Лектины бадана и экстракты бадана, которые не обработаны спиртом этиловым или нагреванием (до температуры 40 °С), могут быть использованы для разработки нового препарата с противогерпесными свойствами.

3. Эффективная концентрация суммы очищенных лектинов бадана, которая тормозит цитопатическое действие вируса герпеса, составляет 1.5 мкг/мл, тогда как очищенный от лектинов экстракт не обладает противовирусной активностью. Это свидетельствует о том, что основными противовирусными компонентами экстракта являются лектины.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Gottesman M.M., Pastan I. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells // Trends in Pharmacological Science. - 1988. - V. 9. - P. 54-58.
- Obama K., Tara M., Niina K. L-asparaginase induced complete remission in Epstein-Barr virus positive, multidrug resistant, cutaneous T-cell lymphoma // Int J. Hematol. - 1999. - № 69. - P. 260-262.
- Doong S.L., Lin M.H., Tsai M.M., Li T.R., Chuang S.E., Cheng A.L. Transactivation of the human MDR1 gene by

hepatitis B virus X gene product // J. Hepatol. - 1998. - № 29. - P. 872-878.

- Gelrath J.H., Kartner N., Bell D.R., Ling V. Multidrug resistance // Cancer Surveys. - 1986. - V.5, № 1. - P.25-46.
- Goldie J.H., Coldman A. The genetic origin of drug resistance in neoplasm: implications for systemic therapy// Cancer Research. - 1984. - V. 44, № 9. - P. 3643-3653.
- Okuyama T. Chitin Derivatives // Protein. - 1970. - V. 15. - P. 47-53.
- Sirica R.J., Woodman A.E. Selective aggregation of L 1210 leukemia cells by the polycation chitosan // J. Natl. Carter.Inst. - 1971. - V.47, № 8. - P. 337-388.
- Yasuhiko F., Koji K., Yoshikaru A. Effect of chitosan feeding on intestinal bill acid metabolism in rats // Lipids. - 1991- V.26, № 5. - P. 395-399.
- Попова Н.В., Кожух І.О., Комир З.В., Мартинов А.В. Перспективи використання рослин роду бадан // Вчені України – вітчизняній фармації: Мат. наук.-практ. конференції. – Харків, 2000. - С. 157-158.
- Edlund U., Hensel A., Frose D., Pfuller U., Scheffler A. Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I // Arzneimittelforschung. - 2000. - № 50. - P. 645-651.
- Франц Х., Пфюллер К. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1983. - № 5. - С. 18-25.
- Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1987. - 334 с.
- Inglot A. D. Antiviral activity of Wratizolin // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). - 1983. - № 31. - P. 601-610.

#### Резюме

Литвиненко В.І., Мартинов А.В., Попова Н.В., Кожух І.А.

#### Деякі технологічні та біофармацевтичні особливості екстракції лектинів бадану

Проведено дослідження кореляції між технологією одержання екстрактів із листя бадану товстолистого та їх фармакологічною активністю. Уперше визначено, що противирусна активність екстрактів обумовлена лектинами і залежить від технології одержання екстрактів. Із збільшенням концентрації спирту етилового та підвищенням температури зменшується противирусна активність по відношенню до вірусу герпесу. Встановлена найменша ефективна концентрація суми лектинів у перерахунку на суху сировину - листя бадану товстолистого.

#### Summary

Litvinenko V.I., Martynov A.V., Popova N.V., Kozukh I.A.

#### Some technological and biopharmaceutical features of *Bergenia crassifolia* lectins extraction

A correlation between the various extracts from *Bergenia crassifolia* leaves production technology the pharmacological activity has been studied. It has been established for the first time that the antiviral activity of extract depends on presence of lectins and on extracts obtaining technology. With the rise of alcohol concentration and temperature the antiviral activity concerning a Herpes virus has been decreased. The least effective concentration of the sum of *Bergenia* leaves lectins has been determined.

**Литвиненко Василий Иванович** (р. 1932).

Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Доктор хим. наук (1995). Академик ИА Украины (2000). Зав. лабораторией химии и технологии ГНЦАС.

**Мартинов Артур Вікторович** (р. 1973). Окончил Национальную фармацевтическую академию Украины (1995). Канд. фарм. наук. Ученый секретарь Харьковского научно – исследовательского института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова.

**Попова Наталья Вячеславовна.** Окончила Национальную фармацевтическую академию Украины (1981). Канд. фарм. наук. Доцент кафедры фармакогнозии НФАУ.

**Кожух Ирина Александровна.** Окончила Национальную фармацевтическую академию Украины (1997). Ассистент кафедры фармакогнозии НФАУ.

УДК 615.322:582.937].011

Горев І.В., Краснікова Т.О., Ковальова А.М., Комісаренко А.М., Крюкова Я. С.  
Національна фармацевтична академія України  
Державний науковий центр лікарських засобів, м. Харків

### Фармакогностичне дослідження *Strophanthus gratus* Franch.

Встановлено основні діагностичні морфолого-анатомічні ознаки насіння *Strophanthus gratus* Franch. (Род. Аросупасеае) і виявлено локалізацію серцевих глікозидів у клітинах сировини, які переважно накопичуються в тканинах шкірки і провідного пучка. Проведено кількісне визначення серцевих глікозидів в насінні строфанту привабливого хроматоспектрофотометричним методом.

Розробка нових лікарських форм, які містять кардіотонічні глікозиди, є актуальним завданням в лікуванні серцевих хвороб. До цього часу препарати, що містять похідні строфантину, в медичній практиці застосовувалися у вигляді парентеральних форм. Нами вперше запропоновані препарати у вигляді пероральної форми – таблеток, які містять кардіотонічні глікозиди групи строфанту. На сьогоднішній день доклінічними і клінічними випробуваннями в НДІ кардіології ім. акад. Н.Д. Стражеско доведена ефективність і тривалість дії строфантину у вигляді таблетованих лікарських форм [1,2].

Тому актуальним стало питання розробки методів аналізу лікарської сировини – насіння *Strophanthus gratus* Franch.

#### Експериментальна частина

#### Морфолого-анатомічне дослідження

#### Об'єкти і методи

Об'єктом дослідження було зріле висушене насіння *Strophanthus gratus* Franch. - строфанту привабливого (Род. Аросупасеае), попередньо очищене, надане фірмою "Reform, Italia s.r.l.", Італія.

Використовували мікроскопи МБР-1 та МБІ-6, мікропрепарати фотографували за допомогою фотоапарату ФЕД-5 на плівку "Мікрат 200". Гістохімічну реакцію на серцеві глікозиди проводили на поперечному зрізі насіння, приготованому у хлоралгідраті та обробленому реактивом Раймонда.

Визначення БАР проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol" із нанесеним шаром силікагелю марки HF 254R. Для спектрофотометричних досліджень речовин в УФ-області використовували прилад СФ-26.

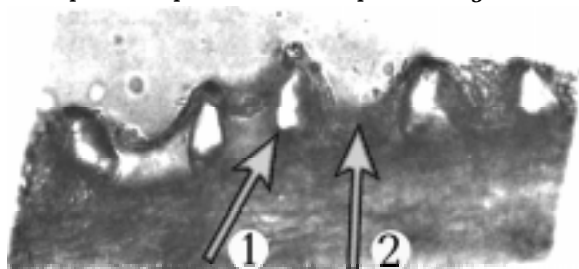
#### Результати досліджень та їх обговорення

Насіння довгасто-веретеноподібної форми, із повздожньо пористою щетинистою поверхнею, із округленою основою і загостреними гранями у вигляді крил. Довжина насіння 12-18 мм, ширина 3-6 мм, товщина 1.5-2 мм. На ввігнутому боці насіння добре помітний світлий рубчик. Колір від світло-жовтого до світло-коричневого. Запах слабкий, неспецифічний, при розтиранні посилюється.

На поперечному зрізі насіння видно, що поверхневий шар шкірки насіння складається із подовжених багатограних клітин із радіально потовщеними стінками, частина яких випнута у вигляді конічних горбиків. Деякі клітини епідерми спадаються і тому поверхня насіння виглядає злегка шершавою. Кутикула шорсткувата і зерниста (Рис.1).

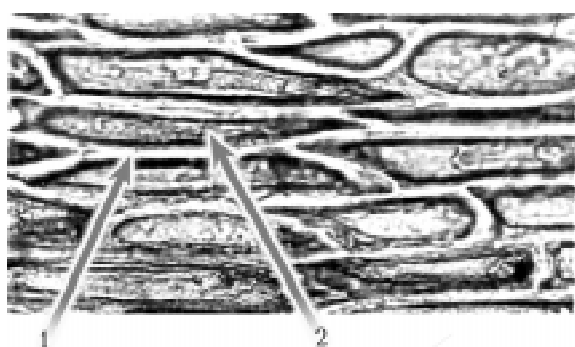
Під епідермою знаходиться шар декількох рядів приплюснутих тонкостінних клітин, які складають інтегумент. Після обробки лугом було виявлено дві кутикули: перша знаходиться між поверхневим і внутрішнім інтегументом, а друга – більш товстостінна – між внутрішнім інтегументом і ендоспермою (Рис.2).

Рисунок 1

**Поперечний сріз насіння *Strophanthus gratus***

- 1 – конічні випити клітин епідермісу  
2 – кутикула

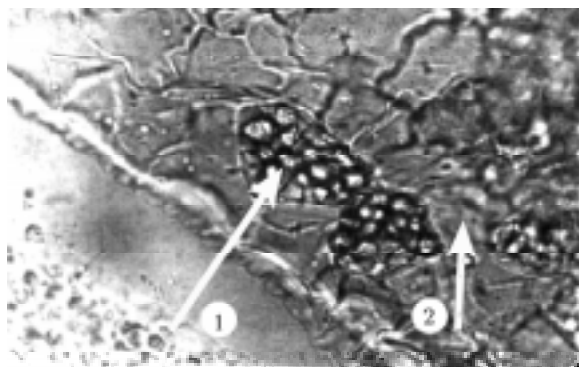
Рисунок 2

**Поперечний сріз зовнішнього шару насіння *Strofantus gratus***

- 1 – надовжені багатогранні клітини  
2 – радіальні потовщення клітинних стінок

В насінні добре виражений зародок, який має дві сім'ядолі, зародковий корінець і зародкову бруньку. Зародок складається із дрібних тонкостінних клітин і оточений ендоспермою. Ендосперма займає чверть площі, складається з товстостінних клітин, які містять краплі олії, алеїронові зерна та, інколи, небагато крохмальних зерен діаметром близько 8 мкм (Рис. 3).

Рисунок 3

**Ендосперма насіння *Strophanthus gratus***

- 1- алеїронові зерна  
2- клітини паренхіми

У результаті гістохімічної реакції спостерігали фіолетове забарвлення усіх тканин зрізу, найбільшу інтенсивність забарвлення мають тканини шкірки і провідного пучка. Забарвлення нестійке і зникає через 1-2 хв.

**Кількісне визначення серцевих глікозидів**

Близько до 1 г (точна наважка) подрібненого насіння додавали 30 мл петролейного ефіру і залишали на 1 год, часто перемішуючи. Верхній шар обережно декантували і фільтрували крізь фільтр діаметром 70 мм. Сировину повторно обробляли петролейним ефіром і за допомогою петролейного ефіру кількісно переносили на фільтр. Висушену на повітрі обезжирену сировину разом із фільтрувальним папером заливали 50 мл 70% етанолу, нагрівали на водяній бані до кипіння і відстоювали протягом 30 хв, періодично перемішуючи. Верхній шар декантували і фільтрували у круглодонну колбу місткістю 250 мл. Залишок сировини ще двічі заливали 70 % етанолом порціями по 30 мл, нагрівали до кипіння, кожну порцію відстоювали протягом 10 хв і фільтрували у круглодонну колбу крізь той же самий фільтр. Фільтрат концентрували при пониженому тиску. Одержаний сухий залишок розчиняли у 20 мл метанолу, фільтрували у мірну колбу місткістю 25 мл, промиваючи колбу і фільтр, і доводили метанолом до позначки.

Для приготування стандартного розчину близько 0.02 г (точна наважка) G-строфантину розчиняли в 5 мл метанолу у мірній колбі місткістю 10 мл і доводили метанолом до позначки.

На лінію старту хроматографічної пластинки "Silufol" мікропіпеткою наносили 100 мкл випробовуваного розчину двома смугами, кожна завширшки 3 см, залишали одну вільну смугу завширшки 4 см (контроль) і наносили двома смугами такої самої ширини по 50 мкл стандартного розчину.

Хроматографували висхідним способом у системі *n*-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:5). Коли фронт розчинників пройшов 15 см від лінії старту, хроматограму виймали і висушували на повітрі. Відрізали частину хроматограми зі стандартним зразком і за допомогою розпилювача обробляли реактивом Раймонда (3 % розчин *m*-динітробензолу в бензолі), висушували у витяжній шафі і обробляли водно-спиртовим розчином калію гідроксиду (7.0 лугу, 25 мл води і 45 мл 96 % спирту). Відмічали синьо-фіолетову смугу проявленого серцевого глікозиду (Rf 0.35-



0.40). На такій же відстані від лінії старту відмічали смуги такої ж величини у випробовуваному розчині, стандарті та контролі.

Знімали шари сорбенту у цих зонах і G-строфантин елюювали 4 мл метанолу при нагріванні на водяній бані до температури 50 °С. До випробовуваного, стандартного і контрольного розчинів додавали по 3 мл розчину натрію пікрату (1 г кислоти пікринової розчиняли в мірній колбі місткістю 100 мл, додавали 5 мл розчину натрію гідроксиду, доводили об'єм розчину водою до позначки) і витримували 30-40 хв у захищеному від світла місці.

Вимірювали оптичну густина одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 494 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння контрольний розчин.

Паралельно вимірювали оптичну густина стандартного розчину.

Вміст строфантину у сировині (X), як середнє з обох смуг, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{D_c \cdot a_{ст} \cdot 25 \cdot 100}{D_{ст} \cdot a \cdot 10} = \frac{D_c \cdot a_{ст} \cdot 250}{D_{ст} \cdot a}$$

де  $D_c$  – середнє значення оптичної густини випробовуваного розчину;

$D_{ст}$  – оптична густина розчину стандартного зразка;

$a_{ст}$  – вміст G-строфантину у стандартному зразку з урахуванням вмісту вологи;

$a$  – маса наважки сировини, у грамах.

Як видно з Рис. 5, результати кількісного визначення знаходяться в межах вірогідності (Табл. 1, Рис. 4).

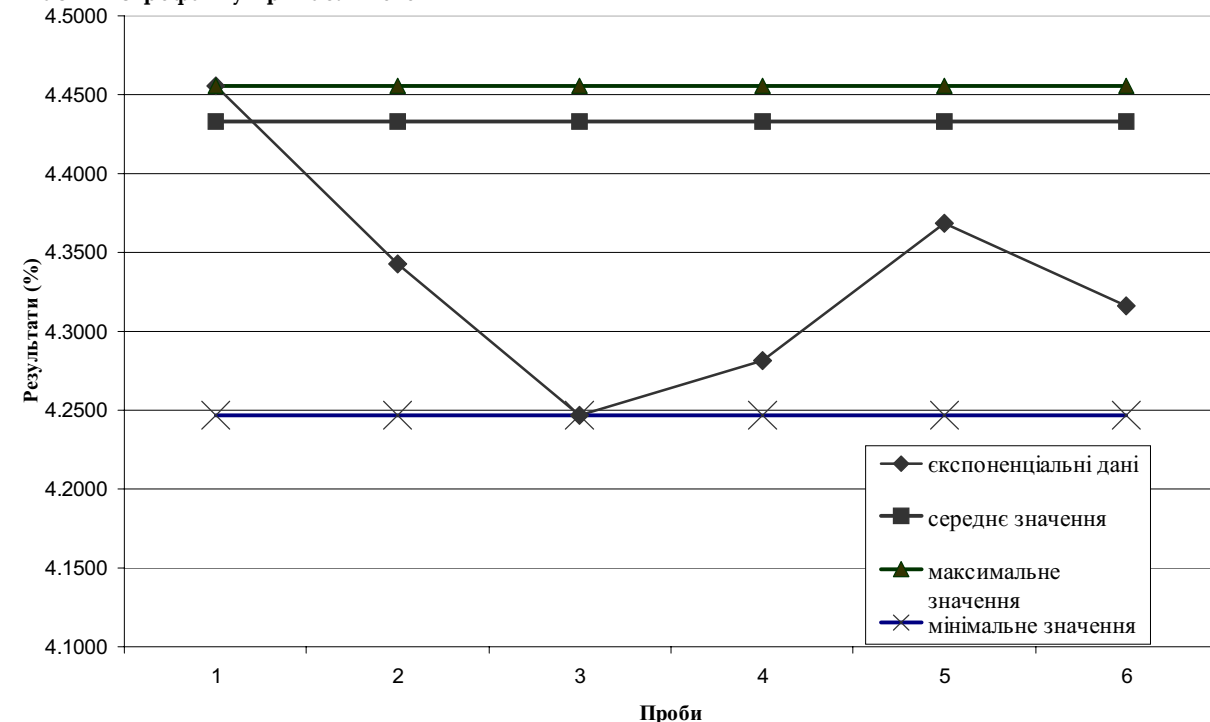
Таблиця 1

Кількісне визначення серцевих глікозидів в насінні строфанту

№ визначення	Наважка	Вміст (%)	Статичний аналіз даних	
			Середнє значення	Стандартна помилка
1	1.2004	4.4559	4.335283333	0.029906827
2	1.0252	4.3426	0.073256465	0.00536651
3	0.8852	4.2466	4.2466	4.4559
4	0.9524	4.2815	4.3687	4.3164
5	1.0020	4.3687	Рівень надійності (95.0%)	0.07687782
6	0.9025	4.3164		

Рисунок 5

Достовірність результатів кількісного визначення серцевих глікозидів в насінні строфанту привабливого



Якісні реакції

1. 0.2 мл розчину, приготованого для кількісного визначення, випарювали на водяній бані, до залишку додавали 0.1 мл розчину кислоти динітробензойної і 0.2 мл розведеного розчину натрію гідроксиду, з'являється червоно-фіолетове забарвлення.

2. На подрібнену сировину наносили декілька крапель суміші кислоти сірчаної і гліцерину (3:1); сировина набуває від світло-рожевого до червоно-фіолетового кольору.

Випробування на домішки

На хроматограмі, одержаній при кількісному визначенні, має бути смуга із Rf 0.35-0.40 і не має бути смуг (плям) сіро-синього або фіолетового кольору з Rf близько 0.24 і Rf, нижче за 0.22.

Випробування на наявність інших видів строфанту.

У порошок насіння при мікроскопії не має бути волосків і кристалів кальцію оксалату.

Не має бути позеленілого насіння.

Висновки

1. Проведено морфолого-анатомічне дослідження насіння *Strophanthus gratus* Franch. (Род, Аросупасеае) і встановлено основні діагностичні ознаки сировини:

- подовжені багатогранні клітини поверхневого шару шкірки із радіально потовщеними стінками і подекуди випнутими конічними горбиками; вміст деяких клітин епідерми зморщений; шорсткувата і зерниста кутикула; інтегумент складають декілька рядів приплюснутих тонкостінних клітин; виявлено дві кутикули: перша знаходиться між поверхневим і внутрішнім інтегументом, а друга — більш товстостінна — між внутрішнім інтегументом і ендоспермою; добре виражений зародок із двох сім'ядолей, зародкового корінця і зародкової бруньки; ендосперма з товстостінних клітин, які містять краплі олії, алеї-ронові зерна, крохмальні зерна;

- серцеві глікозиди локалізуються в усіх клітинах сировини, але найбільше вони накопичуються у тканинах шкірки і провідного пучка.

2. Проведено кількісне визначення серцевих глікозидів в насінні строфанту привабли-

вого хроматоспектрофотометричним способом.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Горев І.В., Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М. Розробка методів стандартизації нових лікарських форм — таблеток корглікону і строфантину-Г // Фармаком. — 2001. - № 2. — С. 47-52.
2. Коваленко В.М., Вікторов О.П., Ковальова А.М., Комісаренко А.М., Горев І.В., Георгієвський Г.В. Таблетовані лікарські форми корглікону і строфантину-Г та їх дослідження // Фармаком. - 2001. - № 3. — 2001. - С. 47-54.

## Резюме

Горев І.В., Краснікова Т.А., Ковалева А.М., Комиссаренко А.Н., Крюкова Я.С.

**Фармакогностическое исследование *Strophanthus gratus* Franch.**

Установлены основные диагностические морфолого-анатомические признаки семян *Strophanthus gratus* Franch. (семейство Аросупасеае) и выявлена локализация сердечных гликозидов в клетках сырья: они преимущественно накапливаются в тканях кожицы и проводящего пучка. Проведено количественное определение сердечных гликозидов в семенах строфанта привлекательного хроматоспектрофотометрическим методом.

## Summary

Gorev I.V., Krasnikova T.O., Kovalyova A.M., Komissarenko A.M., Kryukova Ya.S.

**Pharmacognostic study of *Strophanthus gratus* Franch.**

The main diagnostic morphologic and anatomic signs of *Strophanthus gratus* Franch seeds (Fam. Apocynaceae) were established and the localization of cardiac glycosides which are predominantly accumulated in peel tissues and leading fascicle in the raw material cells was revealed. The cardiac glycoside assay in the seeds of *Strophanthus gratus* was carried out by chromato-spectrophotometric method.

**Горев Іван Вікторович** (н. 1976). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут. Інженер-технолог. Здобувач при ДНЦЛЗ.

**Краснікова Т.О.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1984). Канд. фарм. наук (2000).

**Ковальова Алла Михайлівна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут. Канд. фарм. наук. Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України.

**Комісаренко Андрій Миколайович** (н. 1962). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1984). Доктор фарм. наук (2000). Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України.

**Крюкова Я.С.** Закінчила Національну фармацевтичну академію України (2002). Аспірант НФАУ.

## Одержання лікарських і допоміжних речовин

УДК 615.281:661.183.6.001.5

Зайцев О.І.

Національна фармацевтична академія України

### Вивчення пролонгованого вивільнення декаметоксину з лікарської субстанції Декацеол

Вивчена кінетика вивільнення декаметоксину з цеоліту в розчин. Виявлено вплив на цей процес рН розчину та часу, необхідного для досягнення рівноваги. Встановлено, що концентрація декаметоксину в випробовуваному розчині досягає рівноважних значень протягом 2 год (при рН 1.8) і протягом 3.5 год (при рН 8.3). Розроблена математична модель прогнозує вивільнення декаметоксину при проходженні різних відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) протягом 4-5 год, що дає підставу припускати пролонговану дію субстанції Декацеол.

Пролонгована дія лікарського засобу має велике значення, тому що для досягнення лікувального ефекту деяких лікарських засобів потрібний тривалий час стабільної підтримки певної концентрації діючої речовини в організмі [1]. Це потребує вмісту в лікарській формі пролонгованої дії 2-3 та більше разових доз звичайного лікарського засобу.

Одним із способів зменшення частини діючої речовини, що вивільняється, є іонообмін [2,3]. Іонообмін дозволяє не тільки зв'язати діючу речовину, зменшуючи її токсичність, а, насамперед, у подальшому за рахунок зміщення рівноваги підтримувати стабільну терапевтичну концентрацію діючої речовини без пікових навантажень на організм.

Катіонообмінна здатність синтетичних цеолітів [4,5] дозволяє зв'язувати катіони біологічно активних речовин шляхом іонного обміну іонів натрію цеоліту на активні іони лікарських препаратів.

Найбільш здатні до іонного обміну з синтетичним цеолітом NaA сполуки, що містять іон амонію. Тому для включення до структури цеоліту був вибраний препарат на основі органічних амонійних основ – декаметоксин. Цей препарат виявляє антисептичну дію, пригнічує проникнення та розмноження патогенних мікроорганізмів [2].

Декаметоксин, включений іонообміном до структури цеоліту типу NaA, дозволив одержати лікарську субстанцію під умовною назвою Декацеол [6], яка за певних умов здатна до зворотного іонообміну із вивільненням декаметоксину в розчин.

Вивчення умов впливу на зворотний іонообмін, визначення рівноважних концентрацій та дослідження кінетики вивільнення є

дуже важливим для створення лікарської субстанції Декацеол.

#### Об'єкти та методи дослідження

Проведення досліджень із вивільнення декаметоксину з цеоліту виконувалося з урахуванням умов відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини:

- температури (37°C);
- рН травних соків;
- кількості травних соків;
- часу перебування травних соків у різних відділах ШКТ.

Згідно з [7] умови різних відділів ШКТ наведені в Табл. 1.

Таблиця 1

#### Умови відділів ШКТ

Відділ ШКТ	рН травних соків	Тривалість перебування травних соків у певних відділах ШКТ, год	Кількість травних соків, мл
шлунок	1.6-2.0	1	20-148
дванадцятипала кишка	4.5-5.1	0.5	30-70
тонкий кишечник	7.2-7.5	4	400
верхній відділ товстого кишечника	8.5-9.0	8	-

Цими показниками було обмежено проведення дослідів із вивільнення декаметоксину із цеоліту в розчин кислоти хлористоводневої або натрію гідроксиду.

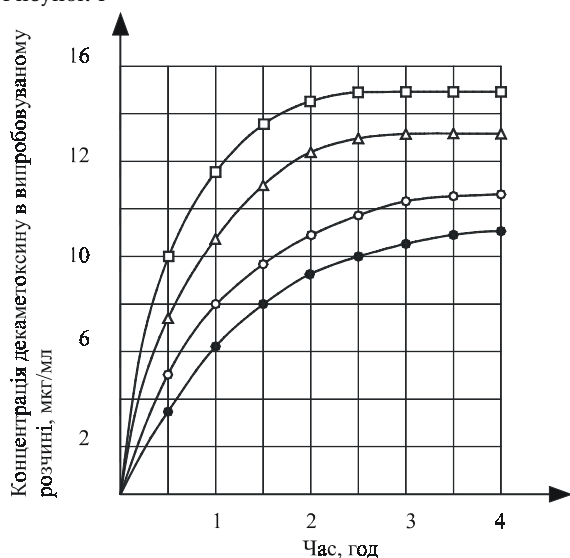
Дослідження проводили в лабораторній установці [8], в яку поміщали розчин з відповідним рН (початковий розчин), а потім додавали Декацеол (випробовуваний розчин). Через кожні 15 хв відбирали пробу випробовуваного розчину і визначали концентрацію декаметоксину згідно [9].

## Обговорення результатів

Проведені дослідження зі зворотного іонообміну між іонами декаметоксину в цеоліті та іонами водню розчину показують, що це тривалий процес, який залежить від початкової концентрації іонів водню в розчині, тобто рН розчину.

На Рис. 1 наведені кінетичні дані вивільнення декаметоксину з цеоліту при різних значеннях рН початкового розчину, при постійному співвідношенні об'єму початкового розчину (200 мл) та маси декацеолу (4 г).

Рисунок 1



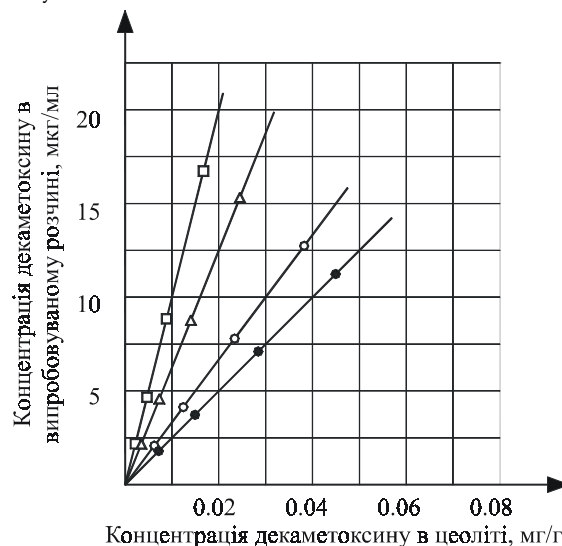
Кінетика вивільнення декаметоксину з цеоліту при різних значеннях рН початкового розчину:

$V_{p-nu} = 200$  мл,  $m_A = 4$  г,  $t = 37$  °C

рН: □ – 1.8; Δ – 4.9; ○ – 7.3; ● – 8.7

Проведення дослідів при різних співвідношеннях об'єму початкового розчину (200±320 мл) та маси декацеолу (4±6 г) із урахуванням різних значень рН розчинів дозволило одержати рівноважні концентрації іонного обміну (Рис. 2).

Рисунок 2



Залежність концентрації декаметоксину в випробовуваному розчині від концентрації декаметоксину в цеоліті при різних значеннях рН початкового розчину

□ – 1.8; Δ – 4.9; ○ – 7.3; ● – 8.7

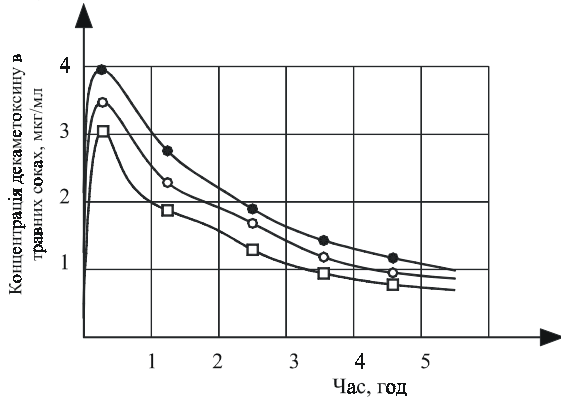
Вивчення іонного обміну дає змогу прогнозувати стан системи при відповідних умовах. Аналіз стану системи в динаміці, при проходженні випробовуваного розчину по різних відділах ШКТ як показано в Табл. 2, дозволяє розрахувати кількість вивільненого з цеоліту декаметоксину.

Таблиця 2

№	Час, год.		Відділ ШКТ	рН травних соків	Кількість травних соків, мл	
	$\tau$	$\Delta\tau$			початкова	кінцева
1	0.25	0.25	шлунок	1.8	20	52
2	0.5	0.25		1.8	52	84
3	0.75	0.25		1.8	84	116
4	1	0.25		1.8	116	148
5	1.25	0.25	дванадцятипала кишка	4.9	148	173
6	1.5	0.25		4.9	173	198
7	1.75	0.25	тонкий кишечник	7.3	198	225
8	2	0.25		7.3	225	250
9	2.5	0.5		7.3	250	300
10	3	0.5		7.3	300	350
11	3.5	0.5		7.3	350	400
12	4	0.5		7.3	400	450
13	4.5	0.5		7.3	450	500
14	5	0.5		7.3	500	550
15	5.5	0.5		7.3	550	600
16	7	1.5		Верхній відділ товстого кишечника	8.7	600
17	10	3	8.7		600	600

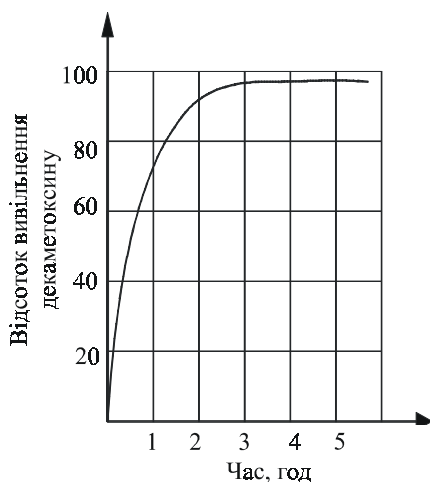
Математична модель вивільнення декаметоксину включає: залежність рівноважних концентрацій, кінетику іонообміну та матеріальний баланс речовин. Кроковий розрахунок дозволив одержати розрахункові концентрації декаметоксину в травних соках (Рис. 3) та прослідкувати за динамікою вивільнення декаметоксину при проходженні різних відділів ШКТ (Рис. 4).

Рисунок 3



**Залежність концентрації декаметоксину в травних соках від часу проходження різних відділів ШКТ при різних дозах Декацеолу (□ – 0.4 г; ○ – 0.5 г; ● – 0.6 г)**

Рисунок 4



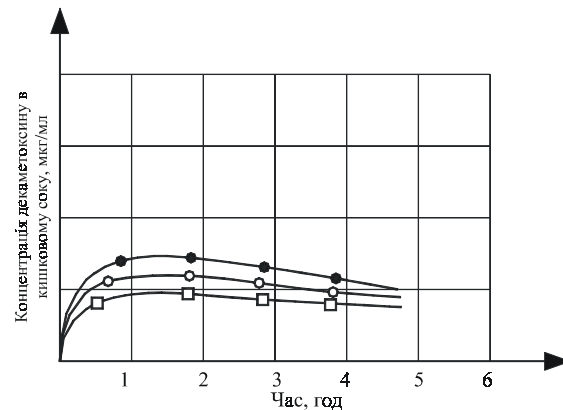
**Динаміка вивільнення декаметоксину з цеоліту**

Математичної моделі цікава тим, що до розрахунку можна брати різні дози субстанції Декацеол і тим самим одержувати різні концентрації декаметоксину в травних соках.

Таким чином, видно, що завдяки іонообмінній здатності цеоліту можна добиватися тривалого (близько 5 год) вивільнення декаметоксину, тим самим забезпечуючи пролонговану дію Декацеолу.

Відповідні дози Декацеолу можна помістити в кишково-розчинну капсулу з метою вивільнення тільки в кишечнику. Задаючи математичній моделі умови, починаючи з № 5 Табл. 2, можна прогнозувати, що вивільнення декаметоксину в кишечнику бути відбуватися інакше (Рис. 5).

Рисунок 5



**Залежність концентрації декаметоксину в кишковому соку від часу при проходженні кишечника при різних дозах Декацеолу: (□ – 0.4 г; ○ – 0.5 г; ● – 0.6 г)**

Це пояснюється тим, що іонообмін в лужних розчинах проходить повільніше, тому концентрація вивільненого декаметоксину в розчині зменшується, але в цьому разі вона має більш стабільне значення.

Звичайно, проведені дослідження та розрахунки прогнозують наявність пролонгованої дії, але остаточні висновки можна бути зробити після проведення клінічних випробувань, чому і будуть присвячені подальші дослідження.

**Висновки**

1. Досліджено кінетику вивільнення декаметоксину з цеоліту в розчин. Виявлені впливи на цей процес рН розчину та часу, необхідного для досягнення рівноваги.

2. На підставі вивчення кінетики вивільнення декаметоксину з цеоліту в залежності від зміни рН прогнозовано використання Декацеолу як ефективного лікарського засобу при лікуванні інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту.

3. Розроблена математична модель вивільнення декаметоксину при проходженні різних відділів ШКТ прогнозує пролонговану дію Декацеолу протягом 4-5 год у наведених умовах випробування.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Чуєшов В.І., Заболотний В.О., Супрун О.В., Гладух С.В., Бобрицька Л.О. Перспективи створення та розвит-

- ку твердых лекарственных форм пролонгированной дии // Вісник фармації. - 1998. - № 2 (18). - С. 58-65.
2. Палий И.Г. Новые аспекты антисептикопрофилактики и антисептикотерапии заболеваний инфекционного генеза: Дис. ... д-ра мед. наук. - Харьков, 1996. - С. 327.
3. Laidler K., Eyring H. Exchange of sodium in clinoptilolite by organic cations // Your Nach. Chem. - 1991. - Vol.29. - P. 2047.
4. Дикий И.Л., Жуковина О.В., Зайцев О.И. Декацеол - комплексный лекарственный препарат комплексной дии // Клінічна фармація. - 2000. - № 4. - С. 49-51.
5. Zaytsev A.I., Zhukovina O.V., Dikiy I.L. et al. Antimicrobial and sorption ability of the synthetic NaA zeolite modified by decamethoxin // Abstracts of 3<sup>rd</sup> Polish-Ukrainian Symposium. - Lviv, 1998. - P.78-79.
6. Жуковина О.В., Зайцев О.И., Жуковин В.И., Дикий И.Л., Чусшов В.И. Одержання комплексного антимікробного препарату на основі синтетичного цеоліту типу NaA та його фізико-хімічні дослідження // Вісник фармації. - 2000. - №1 (21). - С. 20-22.
7. Самура Б.А., Малая Л.Т., Вазир Л.Д. и др. Фармакотерапия. - Харьков: «Прапор», Изд-во НФАУ, 2000. - Т. 1. - 672 с.
8. Зайцев О.И., Молчанов В.И., Жуковин В.И. та ін. Фізико-хімічні аспекти отримання синтетичних алюмосилікатів для створення лікарських засобів комплексної дии // Фармаком. - 2001. - № 1. - С. 33-36.
9. ФС 42 У-6/60 - 365 - 98. Аурисан.

Резюме

Зайцев А.И.

#### Изучение пролонгированного высвобождения декаметоксина из лекарственной субстанции Декацеол

Изучена кинетика высвобождения декаметоксина из цеолита в раствор. Выявлено влияние на этот процесс pH раствора и времени, необходимого для достижения равновесия. Установлено, что концентрация декаметоксина в испытуемом растворе достигает равновесных значений в течение 2 ч (при pH 1.8) и в течение 3.5 ч (при pH 8.3). Разработанная математическая модель позволяет прогнозировать высвобождение декаметоксина при прохождении разных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в течение 4-5 ч, что дает основание предполагать пролонгированное действие субстанции Декацеол.

Summary

Zaytsev O.I.

#### Study of decamethoxine prolonged release from Decaceol medicinal substance

The kinetics of decamethoxine release from zeolite into solution was studied. The influence of solution pH and the time required to achieve an equilibrium on this process was revealed. It was established that decamethoxine concentration in tested solution achieves the equilibrium values within 2 hours (pH 1.8) and 3.5 hours (pH 8.3). The mathematical model developed forecasts the decamethoxine release when passing the diverse sections of gastrointestinal tract (GIT) within 4 - 5 hours, that permit to assume the prolonged effect of Decaceol substance.

**Зайцев Олександр Іванович** (н. 1961). Закінчив Харківський політехнічний інститут (1983). Зав. каф. інженерних та інформаційних технологій НФАУ (1992). Канд. тех. наук (1987). Доцент (1991).

УДК 661.872.922-12:541.138.2

Рой И.Д., Левитин Е.Я., Тульский Г.Г., Оноприенко Т.А.

Национальная фармацевтическая академия Украины

Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

### Получение магнитных жидкостей для медицинских целей

Получена магнитная жидкость на основе магнетита, осажденного с использованием электрохимической стадии окисления Fe(II) → Fe(III). Исследованы характеристики процесса электролитического окисления на диоксидсвинцовом аноде.

Магнитные жидкости являются лиофилизированными, агрегативно устойчивыми коллоидными растворами ферромагнитного вещества (в частности, магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) в жидком носителе (вода, масла и т.п.). Данные системы обладают специфическими эффектами, обусловленными сочетанием магнитных свойств и текучести, которые применяются во многих областях науки и техники [1].

В медицине ферромагнитные жидкости могут быть использованы для определения тока и циркуляции крови, блокирования ар-

териальных аневризм, в рентгенографии [2]. Перспективной и интересной представляется область, связанная с возможностью локализации магнитной жидкости полем для управляемого транспорта лекарственных препаратов.

Принципиальное значение для практического использования магнитных жидкостей имеют вопросы технологии получения устойчивых коллоидных растворов с контролируемыми свойствами. Устойчивость, магнитные и электрические характеристики феррожид-

костей зависят прежде всего от чистоты, формы, структуры и состава магнетита [3].

Для получения магнитной жидкости используют  $Fe_3O_4$ , осажденный из раствора солей  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  и  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . При этом в процессе осаждения на поверхности магнетита адсорбируются ионы  $(FeCl)^+$ ,  $(FeCl)^{2+}$ ,  $(FeClOH)^+$ , ухудшающие магнитные свойства [4].

Задачей настоящей работы является получение магнетита высокой чистоты с улучшенными магнитными свойствам и синтез на его основе магнитной жидкости, которая может быть использована для создания новых магнитоуправляемых лекарственных форм. Для этого из состава исходного раствора были исключены  $Cl^-$ -ионы, раствор приготовлен на основе сульфата железа(II), а затем проведено частичное окисление  $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$ .

Процесс окисления возможен с помощью окислителей (нитрат-ионов, ионов галогеноксикислот) [5]. Однако недостатком этого способа является загрязнение раствора продуктами восстановления окислителей, а также частичное разрушение  $Fe_3O_4$  вследствие окислительно-восстановительных процессов.

Окисление  $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$  возможно также путем барботирования воздуха через раствор при нагревании [6]. Данный способ характеризуется сложностью управления процессом получения оптимального соотношения катионов  $Fe(II)$  и  $Fe(III)$ .

По нашему мнению, более эффективным является электрохимический способ окисления. Кинетика электрохимических процессов является функцией большего числа параметров, чем кинетика химических реакций, поэтому электрохимические реакции можно тоньше и полнее регулировать. В кинетике процессов электрохимического окисления и восстановления важную роль играет природа электрода [7]. Материал электрода должен удовлетворять ряду требований: быть химически и электрохимически устойчивым, а также обладать селективной каталитической активностью, то есть обеспечивать протекание целевой электродной реакции с достаточной скоростью и максимальное торможение побочных реакций.

Применение платиновых анодов сопряжено с большими затратами как на стадии изготовления, так и при эксплуатации — вследствие потерь платины. Альтернативой платиновым являются металлоксидные электроды и в первую очередь диоксидсвинцовый тита-

новый анод [8]. Диоксид свинца имеет высокую электропроводность металлического характера. При анодной поляризации диоксид свинца обладает химической и коррозионной устойчивостью до  $pH > -2$ . Титановый токоподвод улучшает механические свойства и снижает омические потери напряжения в аноде.

### Материалы и методы исследований

Электрохимические исследования проводили в стеклянной ячейке ЯСЭ-2 с помощью потенциостата ПИ-50-1.1 и регистрирующего прибора ПДА1. Электродом сравнения служил хлорид-серебряный ЭВЛ1М 3.1, потенциалы пересчитаны по водородной шкале. Исследуемый раствор содержал  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  — 80 г/л и  $H_2SO_4$  — до  $pH$  1.  $pH$  раствора измеряли с помощью  $pH$ -метра « $pH - 150$ ».

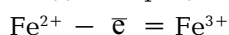
Определение в растворе соотношения концентраций  $C_{Fe^{3+}}/C_{Fe^{2+}}$  проводили перманганатометрическим титрованием.

Размеры частиц магнетита измеряли на электронном микроскопе ЭВМ-100Л, увеличение  $2 \times 10^5$ .

Намагниченность насыщения оценивали согласно [9] по кривой намагничивания, снятой для измеряемого образца в поле с напряженностью 800 кА/м. Кривую намагничивания снимали методом вталкивания образца магнитной жидкости, помещенного в тонкостенную латунную ампулу, в зону постоянного магнитного поля. Измерения проводили с использованием микроверметра Ф191.

### Результаты и их обсуждение

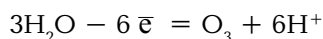
В кислом растворе сульфата железа (II) анодный процесс перезарядки



$$E_0 = 0.771 + 0.0591/g \frac{\alpha_{Fe^{3+}}}{\alpha_{Fe^{2+}}} \quad (a)$$

сопровождается совмещенными реакциями:  $2H_2O - 4e = O_2 + 4H^+$

$$E_0 = 1.228 - 0.0591pH + 0.0147/g P_{O_2} \quad (б)$$



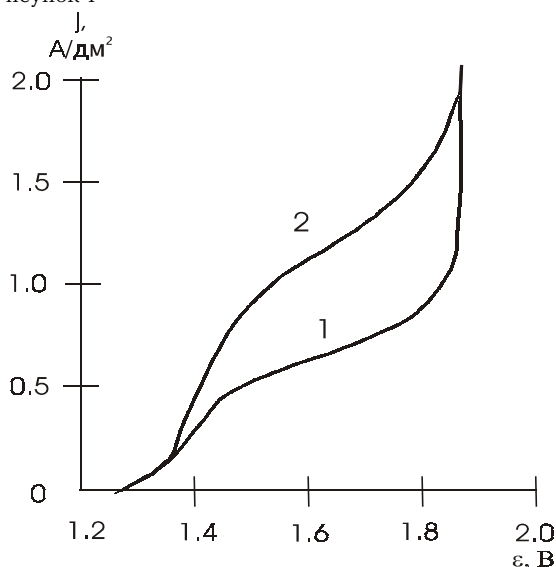
$$E_0 = 1.501 - 0.0591pH + 0.0098/g P_{O_3} \quad (в)$$

при достижении соответствующих потенциалов.

Для изучения кинетики электрохимического окисления в данной системе и выбора оптимальных условий проведения электролиза получены поляризационные кривые — зависимости между смещением потенциала

электрода и плотностью протекающего через электрод тока. Из анализа поляризационных кривых видно, что скорость окисления катионов Fe(II) до достижения потенциала 1.3 В незначительна (Рис. 1). При дальнейшей поляризации процесс (а) значительно ускоряется. Это можно объяснить участием атомарного кислорода, образующегося на аноде при окислении воды в соответствии с уравнением (б). При потенциалах положительнее 1.7 В достигаются условия протекания процесса (в), который является более энергоемким и поэтому нежелательным. Зависимость хода поляризационной кривой от перемешивания (Рис. 1, кривая 2) свидетельствует о диффузионном контроле анодного процесса. Следовательно, для интенсификации процесса необходимо применить перемешивание, что уменьшит толщину приэлектродного диффузионного слоя и позволит проводить процесс окисления при плотностях тока 0.7 – 1.2 А/дм<sup>2</sup>. При данном режиме процесс окисления Fe(II) хорошо управляем и протекает с достаточной скоростью (Рис. 2, кривая 2).

Рисунок 1



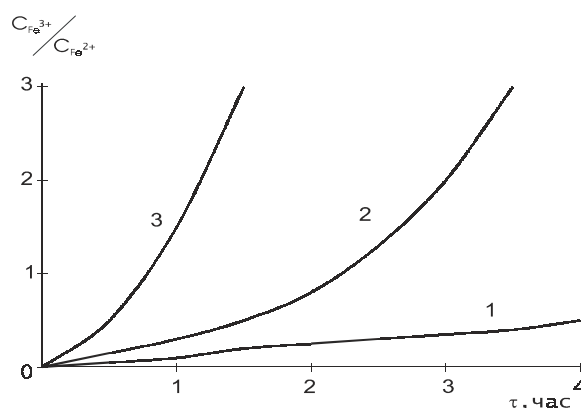
**Анодные поляризационные кривые диоксидсвинцового электрода в растворе сульфата железа (II): 1 – без перемешивания; 2 – с перемешиванием**

В качестве катода использовали титановый стержень. Титан характеризуется невысоким перенапряжением выделения водорода. При соответствующих условиях электролиза (высокая плотность катодного тока, подкисление раствора) потерь железа за счет катодного разряда Fe(II) удастся избежать, так как на катоде протекает преимущественно

реакция восстановления катионов водорода. Железо, выделяясь в небольшом количестве в некомпактном мелкодисперсном состоянии, вновь растворяется в кислой среде.

В результате проведения электролиза получен раствор, содержащий катионы Fe(III) и Fe(II) в молярном соотношении 2:1, при подщелачивании которого образовался осадок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Размеры частиц составили 10-15 нм, магнитная восприимчивость 1.18.

Рисунок 2



**Зависимость соотношения концентраций  $C_{Fe^{3+}}/C_{Fe^{2+}}$  от времени электролиза ( $\tau$ ) при различных плотностях тока ( $j$ ).**

Плотность тока (А/дм<sup>2</sup>): 1 – 0.25; 2 – 1; 3 – 2.5

На основе данного магнетита были синтезированы экспериментальные образцы магнитной жидкости. В качестве среды использовано косточковое масло, в качестве поверхностно-активного вещества — кислота олеиновая. Синтез проводили согласно [10]. Намагниченность насыщения магнитной жидкости составила 35 кА/м.

### Выводы

1. Применение электролиза позволяет сделать процесс окисления Fe(II) → Fe(III) более управляемым за счет регулирования силы тока.

2. Магнетит, полученный с использованием электрохимической стадии окисления, отличается высокой чистотой и улучшенными магнитными характеристиками.

3. Магнитная жидкость на основе полученного Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> может быть использована для создания новых магнитоуправляемых лекарственных форм.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Такетоми С., Тикадзуми С. Магнитные жидкости: Пер. с японск. — М.: Мир, 1993. — 272с.



2. Черкасова О.Г. Магнитные поля и магнитные лекарственные формы в медицине (обзор) // Химико-фармац. журн. — 1991. — № 5. — С. 4 — 11.
3. Ахалая М.Г., Какиашвили М.С., Волтер Э.В. и др. Получение и использование магнитных жидкостей с легированной феррофазой // «13 Рижское совещание по магнитной гидродинамике»: Тезисы докл. — Саласпилс, 1990. — С. 181 — 182.
4. Блум Э.Я., Майоров М.М., Цеберс А.О. Магнитные жидкости. — Рига: Зинатне, 1989. — 388 с.
5. Заявка 2013617 ФРГ, кл. С 01 G 49/02. Способ получения смешанного окисла железа, долго сохраняющего магнитные свойства. - Заявл. 20.09.79. - Опубл. 1980. - Бюл. № 2.
6. Патент 4108787 США кл. С 01 G 49/06. Способ получения ферромагнитной окиси железа. - Заявл. 22.08.78. - Опубл. 1979. - Бюл. № 5.
7. Антропов А.И., Теоретична електрохімія. — К.: Либідь, 1993. — 544с.
8. Горбачов А.К. Технічна електрохімія. Частина I. Електрохімічні виробництва хімічних продуктів. — Х.: ВАТ "Видавництво "Прапор", 2002. — 254 с.
9. Фертман В.Е. Магнитные жидкости. — Минск: Высшая школа, 1988. — 183 с.
10. Берковский В.М., Медведев В.Ф., Краков М.С. Магнитные жидкости. — М.: Химия, 1990. — 239 с.

**Резюме**

Рой І.Д., Левітін Є.Я., Тульський Г.Г., Онопрієнко Т.О.

**Одержання магнітних рідин для медичних цілей**

Одержана магнітна рідина на основі магнетиту, який осаджено з використанням електрохімічної стадії окиснення Fe(II) → Fe(III). Досліджені характеристики процесу електролітичного окиснення на діоксидсвинцевому аноді.

**Summary**

Roy I.D., Levitin Ye.Ya., Toolskiy G.G., Onoprienko T.A.

**Obtaining of magnetic fluids for medicinal purposes**

The magnetic fluid on a basis of magnetite deposited using the electrochemical stage of Fe(II)→Fe(III) oxidation was obtained. The characteristics of electrochemical oxidation process with lead dioxide anode were studied.

**Рой Ирина Дмитриевна.** Окончила факультет технологии неорганических веществ Харьковского политехнического института (1984). Работает в НФАУ (с 1993). Доцент кафедры неорганической химии. Канд. тех. наук (1992).

**Левитин Евгений Яковлевич** (р.1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1974). Работает в НФАУ (с 1978). Зав. кафедрой неорганической химии (1991). Канд. фарм. наук (1980).

**Тульский Геннадий Георгиевич** (р. 1962). Окончил факультет технологии неорганических веществ Харьковского политехнического института (1986). Работает в НТУ ХПИ (с 1986). Доцент кафедры технической электрохимии. Канд. тех. наук (1994).

**Онопрієнко Татьяна Алексеевна.** Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1966). Работает в НФАУ (с 1993). Доцент кафедры неорганической химии. Канд. хим. наук (1977).

## Ферменти

---

УДК 615.322:582.739

Січкач Л.А., Діхтярьов С.І., Сухінін В.М.  
Державний науковий центр лікарських засобів., м. Харків

### Одержання лікарської рослинної субстанції інгібітора трипсину

Із метою організації промислового виробництва інгібітора трипсину з насіння *Glycine max* (L.) Merr. для застосування в медичній практиці проведена стандартизація технологічного процесу та оптимізовані основні параметри та режими на кожній технологічній стадії.

Протеолітичні ферменти (протеази) та їх інгібітори складають протеолітичну систему організму, із якою пов'язані такі захисні функції, як гемостаз, фібриноліз, імунні реакції та ін. [1]. При спадковій або набутій недостатності інгібіторів протеаз організм не здатний контролювати активність ферментів, і це призводить до виникнення патологічних станів різної етіології. Виявлено, що надмірний протеоліз лежить в основі розвитку деструктивних, запальних, алергічних реакцій, процесів інвазії злоякісних пухлин [1-

4]. Такий загальний характер активації протеолітичних ферментів вказує на можливість цілеспрямованої дії на них за допомогою інгібіторів протеолізу екзогенного походження. Зараз у клініках України для лікування панкреатитів, септичного перитоніту, важких шоківих станів, наслідків опіків і травм, для зупинки гіперфібринолітичних кровотеч використовують імпортовані препарати на основі інгібіторів, виділених із тканин тварин (контрикал, гордокс, трасилол), та, в окремих випадках, амінокапронову кислоту вітчизняно-

го виробництва [5, 6]. Приготовані з субстанцій синтетичного та, особливо, тваринного походження вони можуть викликати алергічні реакції організму. У цьому відношенні більш «м'яко» діють інгібітори рослинного походження [6, 7].

У даній роботі представлені результати досліджень із розробки технології одержання оригінальної високоочищеної рослинної субстанції інгібітора трипсину для застосування в медичній практиці.

#### *Експериментальна частина*

Як сировина для виділення інгібітора трипсину використовувалося насіння сої щетинистої (*Glucine max* (L.) Merr.) сорту вітчизняної селекції, зібране на дослідному полі Інституту олійних культур, м. Запоріжжя.

Подрібнення насіння сої здійснювали за допомогою валкової дробарки, дискового млина та екстрактора фірми «Росс» (Україна), обладнаного подрібнюючою мішалкою (швидкість обертання — 3000 об/хв). Технологічні властивості сировини вивчали за методиками, розробленими проф. І.О. Муравйовим [8]. Кристалографію соєвої муки оцінювали кристалографічним методом за допомогою мікроскопу «Microphot D 16B» за методикою, розробленою у ДНЦЛЗ.

Для осадження супутніх білків використовували хлористоводневу, оцтову та лимонну кислоти.

Діафільтрацію та концентрування соєвого екстракту перед нанесенням на колонку з афінним сорбентом, а також відмивку очищеного інгібітора трипсину від кислоти здійснювали на ультрафільтраційній установці УПЛ-0.6 (ДКБТБМ, м. Кіриши, Росія) із використанням фільтруючих модулів із порожнистими волокнами.

Афінну хроматографію проводили на установці фірми «Pharmacia» (Швеція), обладнаній УФ-детектором, насосом, колектором фракцій, самописним приладом та колонкою, що заповнена біоспецифічним сорбентом трипсин-сефарозою 4В. Біоспецифічний сорбент синтезували за методикою, наведеною у [9].

Евтектичну температуру розчину соєвого інгібітора трипсину визначали методом вимірювання електричного опору замороженого розчину [10]. Установка складалася з омметра цифрового В7-35, вимірювальної фторопластової комірки із платиновими електродами, морозильної камери HCL 250-70 (Че-

хословаччина), обладнаної датчиками температури морозильної камери та заморожуваного розчину, зв'язаних із точковим самописним приладом для реєстрації цих температур. Відстань між електродами дорівнювала 0.025 м, площа провідного шару —  $8 \cdot 10^{-5}$  м<sup>2</sup>. За результатами експерименту обчислювали питомий електричний опір  $r$  і будували графік залежності питомого опору від температури розчинів у напівлогарифмічному масштабі, із якого знаходили евтектичну температуру.

#### *Результати та їх обговорення*

Розроблений нами спосіб одержання інгібітора трипсину з насіння сої включає такі стадії: стадія підготовки сировини, на якій здійснюється промивка насіння від пилу, а також проводиться процес набухання насіння з метою підготовки його для наступної операції; подрібнення й екстрагування насіння сої з наступним центрифугуванням одержаного екстракту; осадження супутніх білків; діафільтрація та концентрування екстракту; афінна хроматографія; ліофільне висушування продукту.

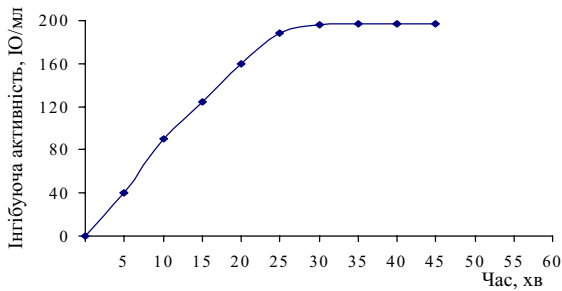
Із метою підбору обладнання і розрахунку кількості води, потрібної для процесу набухання насіння, нами були встановлені технологічні властивості сировини, такі як насипна маса —  $(0.76 \pm 0.04)$  г/см<sup>3</sup>, коефіцієнт вбирання води —  $(1.44 \pm 0.01)$ , коефіцієнт збільшення об'єму —  $(2.91 \pm 0.07)$ .

В останні роки розробляються технологічні прийоми і обладнання, що дозволяють інтенсифікувати процес екстракції. До таких прийомів відноситься подрібнення сировини в середовищі екстрагенту, який було застосовано нами при одержанні екстракту з насіння сої. Такий спосіб подрібнення насіння дозволив уникнути пилоутворення (на відміну від класичних способів подрібнення за допомогою валкової дробарки або млина), заощадити час за рахунок об'єднання процесів подрібнення й екстрагування. Частки муки при цьому утворювалися більш однорідні за розміром, добре змочувалися розчинником, що дало змогу у 2 рази зменшити кількість екстрагенту й у 4 рази — тривалість екстракції порівняно зі способом простої мацерації. Середній розмір часток дорівнював 15-20 мкм.

У ході експериментальних досліджень як екстрагент для виділення інгібітора трипсину обрали воду. Це дає змогу використовувати шрот сої (відходи виробництва) у харчовій промисловості.

Повний вихід інгібітора спостерігається вже через 30 хв від початку екстракції (Рис. 1). Подальше продовження процесу не призводило до збільшення виходу продукту, тому ми зупинилися на часі екстрагування  $(30 \pm 5)$  хв. Далі екстракт відділяли від шроту центрифугуванням при швидкості обертання ротору 3000 об/хв протягом 10-15 хв.

Рисунок 1.



**Залежність виходу інгібітора трипсину від тривалості екстрагування.**

Для очищення інгібітора трипсину від супутніх білків ми використовували спосіб виборчої денатурації цих білків при екстремальних значеннях рН. Найкращі результати одержали при застосуванні органічних кислот. Супутні білки у вигляді осаду видаляли за допомогою центрифуги і отримували прозорий екстракт інгібітора трипсину, який використовували для наступних досліджень.

Видалення з екстракту низькомолекулярних домішок і пігментів, які заважали наступній операції, проводили за допомогою поєднання методів діа- та ультрафільтрації, які ефективно забезпечують очищення, розділення та концентрування розчинів білків і широко застосовуються у промисловості [11]. У результаті проведених досліджень були оптимізовані параметри процесів діа- та ультрафільтрації. Досліди показали, що трикратний об'єм розчинника дозволяє збільшити питому активність екстракту в 1.9 рази, при цьому трипсинінгібуюча активність спостеріга-

лася тільки в концентраті (Табл. 1), що нам і було потрібно.

Із метою одержання високоочищеного кінцевого продукту для подальшого виділення інгібітора трипсину ми застосували метод афінної хроматографії з використанням біоспецифічного сорбенту трипсин-сефарози 4В. Головна перевага методу полягає в його потенційно високій вибірковості, що дозволяє добувати із суміші біологічно активних речовин компоненти, представлені в зовсім незначній кількості, тобто досягати за одну стадію технологічного процесу очищення необхідної речовини у декілька десятків або сотень разів. Сорбенти постачаються фірмами «Pharmacia» (Швеція), «Serva», «Merck» (Німеччина), «Toyosoda» (Японія) та ін.

Важливими операціями при афінній хроматографії є сорбція одержуваної речовини на біоспецифічному сорбенті, а потім її елюція. Успішне проведення цієї операції залежить від вихідної концентрації екстракту (він не має бути дуже розведеним), природи, іонної сили і значення рН посадкового буфера, тривалості й швидкості процесу.

Вивчення впливу величини рН середовища (Рис. 2) показало, що у кислому середовищі (рН 3.0-4.0) зв'язування інгібітора з біоспецифічним сорбентом незначне, підвищення величини рН призводить до відповідного збільшення сорбції інгібітора, яка досягає максимуму при рН від 7.0 до 8.0. Потім сорбція інгібітора зменшується. Виходячи з одержаних результатів, для сорбції інгібітора трипсину на біоспецифічному сорбенті нами було обрано широко застосовуваний трис(гідроксиметил)амінометановий (трисовий) буфер, який має буферну ємність в області рН 7.0-8.0. При використанні цього буфера сорбція інгібітора з екстракту дорівнювала практично 90 %, а неспецифічна сорбція супутніх білків була незначною.

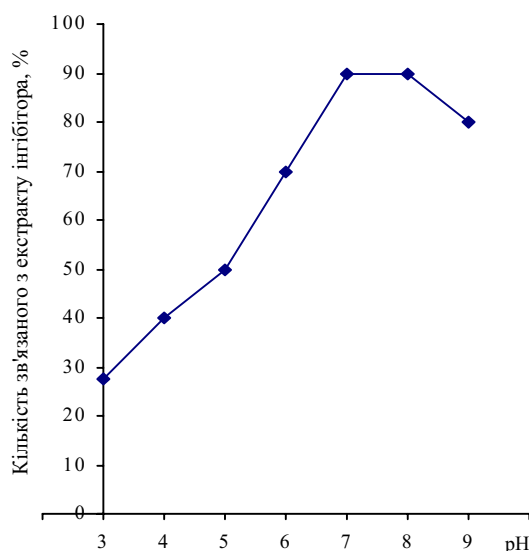
Таблиця 1

**Результати змінення параметрів екстракту**

Об'єкт аналізу	рН	D <sub>280</sub> (розведення - 10 раз)	Інгібуюча активність ІО/мл	Концентрація білка, мг/мл	Питома активність, ІО/мг
Нативний екстракт	3.7 ± 0.2	0.55	209 ± 2	16 ± 0,3	13 ± 2
Концентрат	5.3 ± 0.2	0.8	240 ± 2	9.5 ± 0.3	25.3 ± 2
Ультрафільтрат (остання порція)	5.4 ± 0.3	0.01 (без розведення)	0	0	0

Примітка. n = 5, P = 95 %

Рисунок 2



#### Вплив величини рН середовища на сорбцію інгібітора трипсину з екстракту

Для десорбції інгібітора необхідно було послабити зв'язок, що утворює фермент-інгібіторний комплекс. Проведене вивчення впливу складу елюенту на вихід інгібітора трипсину та швидкість десорбції дозволило встановити, що інгібітор трипсину десорбувався із колонки при зниженні значення рН середовища, і особливо ефективно - при використанні кислоти хлористоводневої. Таким чином, у ході досліджень були оптимізовані умови проведення процесу афінної хроматографії, що дозволило виділяти до 90 % інгібітора трипсину з вихідного екстракту.

Так як отриманий інгібітор виявився нестійким у розчині, ми проводили його висушування способом сублімаційного (ліофільного) сушіння у вакуумі. У ході досліджень були встановлені технологічні режими процесу сушіння субстанції. Необхідною умовою є заморожування розчину і сублімація льоду при температурі не вище евтектичної точки розчину, яка в нашому випадку становила 28 °С. Субстанцію висушували до залишкової вологи 3 % (у відповідності до вимог проекту АНД).

Висушена субстанція інгібітора трипсину представляла собою розчинний у воді порошок білого або білого з жовтуватим відтінком кольору.

Встановлені параметри та режими технологічного процесу одержання інгібітора трипсину покладені в основу розробки технології лікарського засобу на основі соєвого

інгібітора трипсину у вигляді ліофілізованого порошку.

#### Висновки

1. У результаті проведених досліджень розроблена і стандартизована технологія одержання нової лікарської субстанції – інгібітора трипсину з насіння сої.

2. Оптимізовані технологічні режими проведення процесів екстракції, діа- і ультрафільтрації, афінної хроматографії, ліофільного сушіння.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Локшина Л.А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов // Биорганическая химия. – 1994. – Т. 20, № 2. – С. 134-142.
2. Оглоблина О.Г., Арефьева Т.И. Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей // Биохимия. – 1994. – Т. 59, вып. 3. – С. 340-352.
3. Радловська З.Т. Біохімічні зміни в крові та лейкоцитах периферійної крові у пацієнтів з гострим запаленням // Укр. мед. часопис. – 2000. - № 2(16). – С. 133-136.
4. Jochum M., Duswald K.-H., Dittmer H., Fritz H. // Proteinase action. - Ed. P.Elodi. – Budapest: Akademiai Kiado Press, 1984. – P. 369-387.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – Харьков: Торсинг, 1998. – Т. 2. – 592 с.
6. Ларионова Н.И., Балабушевич Н.Г., Гладышева И.П. и др. Природные ингибиторы протеиназ как основа для создания новых лекарственных средств // Вопр. мед. химии. – 1994. – Т. 40, № 3. – С. 25-31.
7. Сичкарь Л.А., Корчагина Л.Н., Дихтярев С.И. Поиск растительных источников ингибиторов протеиназ // Фармаком. – 2001. - № 2. – С. 32-35.
8. Муравьев И.А. Технология лекарств. – М.: Медицина, 1980. – Т. 1. – 392 с.
9. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
10. Новикова Л.С., Шубина Г.Н. Определение эвтектических температур глазных капель, содержащих водорастворимые витамины // Хим.-фарм. журн. – 1991. - № 1. – С. 79-80.
11. Парр Г.С., Рожанская Т.И. Ультрафильтрационные процессы выделения биологически активных веществ: Обзор. информ. – М.: ВИНТИ, 1986. - № 6. – 32 с.

#### Резюме

Сичкарь Л.А., Дихтярев С.И., Сухинин В.Н.

#### Получение лекарственной растительной субстанции ингибитора трипсина

С целью организации промышленного производства ингибитора трипсина из семян *Glycine max* (L.) Merr. для применения в медицинской практике проведена стандартизация технологического процесса и оптимизированы основные параметры и режимы на каждой технологической стадии.

#### Summary

Sichkar L.A., Dikhtyarev S.I., Sukhinin V.N.

#### Obtaining of trypsin inhibitor plant medicinal substance

With the purpose of organization of trypsin inhibitor production industrial technology from *Glycine max* (L.) Merr. seeds for application in medical practice the standardization of technological process was carried out and

the basic parameters and regimens at each technological stage were optimized.

**Січкара Лілія Анатоліївна.** Закінчила Харківський державний політехнічний університет (1996). Мол. наук. співробітник лабораторії хімії та технології біополімерів ДНЦЛЗ (2000).

**Діхтярьов Сергій Іванович** (н. 1951). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1973).

Працює в ДНЦЛЗ (із 1975). Заст. директора з наукової роботи (1990). Зав. лабораторії хімії та технології біополімерів (1995). Доктор фарм. наук (1992). Професор (2002).

**Сухінін Валерій Миколайович.** (н. 1947). Закінчив Донецький університет. Працює в ДНЦЛЗ (із 1971). Канд. фарм. наук (1985). Ст наук. співробітник лабораторії інфузійних і ампульованих лікарських засобів (2000).

## Готові лікарські засоби

УДК 6.16-31-089.5:615.451.35

Шакина Т.Н., Компанеев Е.И., Перешивайло Т.Н.,  
Хомякова Л.Г., Ефоян А.С., Волков В.В.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков  
АО «Стома»

### Пути решения озоновой проблемы в области производства фармацевтических аэрозолей на АО «Стома»

В статье приведены результаты изучения основных технологических характеристик новой клапанно-распылительной системы с механическим насосом для аэрозольных препаратов производства АО «Стома». Установлены параметры определения средней массы одной дозы, воспроизводимость первой дозы, дисперсность, диаметр рабочей зоны, угол распыла для воды, спирта этилового, препаратов «Ингалипт», «Каметон», «Камфомен», «Пропосол». На основании полученных результатов изучения клапанно-распылительной системы с механическим насосом производства АО «Стома» были составлены разделы «Технические требования» и «Методы испытания» для ТУ на клапан беспропеллентный с шариком.

Согласно «Программе прекращения в Украине производства и использования озоноразрушающих веществ» (Постановление Кабинета Министров Украины от 17.10.96 г. № 1274) [1] Государственный научный центр лекарственных средств и АО «Стома» проводят совместные работы по сокращению веществ в медицинских аэрозолях.

Одним из путей такого сокращения является исключение озоноразрушающих веществ (хладонов 11 и 12) из состава уже выпускаемых аэрозольных препаратов и перевод клапанно-распылительных систем на механические насосы.

Из анализа номенклатуры зарубежных аэрозольных препаратов следует, что основная группа аэрозолей для применения в стоматологии, оториноларингологии, хирургии и др. уже не содержит хладонов и снабжена механическими клапанно-распылительными системами. Механические насосы производства ряда фирм, например, «Coster», Италия, «Pfeiffer», Германия, «Sofab», Франция, «Koh-i-Noor», Чехия, обеспечивают необходимые для медицинских аэрозолей показатели [2].

Как показали результаты экспериментов, перевод ряда медицинских аэрозолей на беспропеллентную упаковку - далеко не самый легкий путь, так как возникает необходимость детального изучения каждого препарата. Изменение состава вследствие исключения пропеллента влечет за собой изменения в спецификации по контролю качества, проведение дополнительных исследований по изучению эффективности, безвредности и стабильности препарата в процессе хранения.

Разработка технологических приемов получения лекарственной формы связана с дополнительным изучением физико-химических свойств содержимого и возможности его эвакуации с помощью механической распыляющей системы [3]. При этом необходимо обеспечить полное соответствие технологических параметров нового препарата предшествующему.

В частности, одним из наиболее важных требований, предъявляемых к лекарственным препаратам, является точность дозы и однородность дозирования [5]. Для аэрозолей с механической системой доставки, кроме

этих показателей, важен и показатель масса первой дозы, выдаваемой клапаном.

Ряд ведущих зарубежных фармацевтических фирм, например, «Mask», «Norton», «Boehringer Ingelheim», «Asta medica» уже производят дозированные аэрозольные препараты для применения в кардиологии, ЛОР-практике и др. [2]. Показатель однородность дозирования у них обеспечивается использованием механических распылительных систем, обеспечивающих также воспроизводимость массы первой дозы. Зачастую информация о таких распылительных системах является строго конфиденциальной, в частности, фирма «Mask» - производитель препаратов для применения в кардиологии, отказывает в продаже механических клапанов, которые используются только для препаратов данной фирмы. Следует также обратить внимание, что механические насосы — более сложная конструкционная система, поэтому их цена значительно выше, чем клапанов, работающих под давлением [4]. Клапаны, обеспечивающие показатель однородности дозирования, имеют высокую цену, поэтому отечественным производителям не под силу выдержать ценовую конкуренцию на фармацевтическом рынке Украины.

В связи с вышеизложенным, ГНЦАС и АО «Стома» были начаты совместные работы по созданию отечественного механического насоса, изучению его свойств и разработке на него технических условий.

Акционерное общество «Стома» было и до настоящего времени остается единственным производителем комплектующих для аэрозольных упаковок. Предприятие производит аэрозольные баллоны с полимерным покрытием (БА 35, 65, 15), клапаны нажимные недозирующие (КНН) и клапаны нажимные дозирующие (КНД), имеющие различия как по конструкционным особенностям, так и по использованию различных материалов.

За многолетнюю практику продукция АО «Стома» зарекомендовала себя как в Украине, так и в странах СНГ высоким качеством, надежностью в эксплуатации; параметры работы клапанно-распылительных систем отвечают современным требованиям. Наряду с перечисленными достоинствами, комплектующие элементы аэрозольных упаковок отличаются также доступной ценой, что позволяет АО «Стома» - основному производителю медицинских аэрозолей, выдерживать конку-

ренцию на фармацевтическом рынке Украины и в ближнем зарубежье.

Клапанно-распылительная система является неотъемлемой частью аэрозольной упаковки и наиболее важным ее узлом. От качества работы клапанно-распылительной системы, ее надежности и других эксплуатационных критериев зависит работа всей аэрозольной упаковки в целом. Механический клапан должен обеспечивать герметичность упаковки в течение срока годности препарата (отсутствие утечки из распыляющего отверстия), стабильность препарата на протяжении всего срока хранения, работоспособность пружинного механизма и выдерживать ряд требований технологического характера, а именно: среднюю массу лекарственного средства в одной дозе; дисперсность (размер частиц распыляемого препарата); качество распыления (угол распыла, при котором факел распыла образует статический отпечаток с наибольшей рабочей зоной) [3, 5].

Целью нашей работы явилось сравнительное изучение этих показателей для лекарственных препаратов («Аэрозоль Ингалипт», «Аэрозоль Пропосол», «Аэрозоль Каметон», «Аэрозоль Камфомен») производства АО «Стома». В качестве клапанно-распылительной системы, наряду с новым клапаном АО «Стома», использовали клапаны фирмы «Pfeiffer», Германия, и «Coster», Италия.

#### *Средняя масса одной дозы*

Методика определения средней массы лекарственного средства в одной дозе заключается в следующем.

При температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  распылителем производят 5-6 нажатий на шток клапана до получения дисперсной струи. Затем баллон с распылителем взвешивают с точностью до 0.01 г ( $m_1$ ), нажимают на шток клапана от 1 до 20 раз и вновь взвешивают ( $m_2$ ).

Среднюю массу одной дозы, в граммах, ( $m_{\text{ср.}}$ ) вычисляют по формуле:

$$m_{\text{ср.}} = \frac{m_1 - m_2}{n},$$

где  $n$  — число нажатий.

В результате изучения этого показателя установлено:

1. Средняя масса одной дозы, выдаваемой механическим клапаном (АО «Стома») при различном количестве нажатий на шток клапана, равна  $0.01 \pm 10\%$  (для воды);  $0.01 \pm 20\%$  (для спирта этилового); для препаратов «Каметон» и «Камфомен» —  $0.01 \pm 15\%$ ; для пре-

парата «Ингалипт» -  $0.01 \pm 20$  %; и для препарата «Пропосол» -  $0.01 \pm 10$  %. Для импортных клапанов степень отклонения от средней массы одной дозы при различном количестве нажатий на шток клапана равна нулю (для воды, спирта этилового, для всех четырех препаратов).

2. Масса первой дозы, выдаваемой механическим клапаном (АО «Стома»), через 1 ч уменьшилась на 50 % (для воды); на 20 % (для спирта этилового); на (20-30) % (для препаратов «Каметон», «Камфомен», «Ингалипт», «Пропосол»); через 12 ч – уменьшилась на 80 % (для воды и для спирта этилового); на (50-60) % (для всех четырех препаратов).

Для импортных клапанов масса первой дозы, выдаваемой клапаном, не менялась в течении 1-12 ч (для всех испытуемых жидкостей) и только через 24 ч наблюдалось уменьшение массы первой дозы на (20-25) %.

Таким образом, установлено, что с течением времени масса первой дозы, выдаваемой механическим клапаном производства АО «Стома», уменьшается. Для получения необходимой массы первой дозы во всех случаях (вода, спирт этиловый, препараты) необходимо производить дополнительное количество нажатий на шток клапана. Для воды, спирта этилового, «Пропосола» – (3 + 1); для «Каметона» и «Ингалипта» – (4 + 1); для «Камфомена» – (6 + 1).

#### *Определение размера частиц*

Дисперсность характеризуется размером аэрозольных частиц, выходящих из отверстия распылительной головки клапана. Для определения дисперсности аэрозольные частицы улавливают и фиксируют на предметном стекле. Размер аэрозольных частиц определяют с помощью микроскопа.

Методика определения дисперсности заключается в следующем.

На предметное стекло наносят тонкий слой смеси вазелина и масла вазелинового (1:1) для фиксации аэрозольных частиц. Испытуемый препарат распыляют с помощью механического клапана, нажимая на шток клапана до упора, пока не образуется аэрозольное облако. В аэрозольное облако вносят подготовленное предметное стекло, на которое осаждаются частички испытуемого раствора.

Размер частиц определяют с помощью микроскопа, в окуляр которого вставляют специальную сетку с ценой деления 20 мкм при увеличении (10x8). Определение прово-

дят в 25 полях зрения. Размер частиц определяют вдоль наиболее длинной оси.

Установлено, что размер основной массы самых крупных аэрозольных частиц как для воды, так и для спирта этилового при использовании механического клапана АО «Стома» и импортных клапанов не превышает 100 мкм. Для препаратов «Ингалипт» и «Пропосол» основная масса частиц имеет размеры 60-80 мкм как при использовании отечественного клапана, так и при использовании импортного. Для препаратов «Каметон» и «Камфомен» размер аэрозольных частиц определить не удалось, так как клапаны (как отечественные, так и импортные) при нажатии выдавали струю жидкости без распыления, т.е. дисперсность в данном случае отсутствовала.

#### *Определение качества распыления по статическим отпечаткам факелов (угла распыла)*

Качество распыления определяют по статическим отпечаткам факела распыла. Обычно статический отпечаток имеет три зоны:

$s_1$  - площадь внутреннего плотного участка, состоящую из крупных аэрозольных частиц;

$s_2$  - полезную или рабочую площадь, состоящую из мелкого тумана аэрозольных частиц;

$s_3$  - площадь внешней зоны разброса частиц.

При хорошем распылении препарата статический отпечаток имеет наименьший диаметр плотного участка, наибольшую площадь рабочей зоны и наименьший разброс во внешней зоне.

Для определения статического отпечатка факела распыла использовали установку, состоящую из направляющих, по которым передвигается экран, и столика для установки аэрозольного баллона. На экран крепится фильтровальная бумага, на которую наносят статический отпечаток испытуемого раствора.

Статический отпечаток связан с углом распыла  $\alpha$ , по которому можно количественно характеризовать получаемый отпечаток. Для определения угла распыла по статическим отпечаткам факелов измеряют диаметр полезной или рабочей зоны –  $d$ , диаметр отверстия распылителя –  $d_p$ , и расстояние от распылителя до экрана –  $l$ .

Угол  $\alpha$ , образуемый двумя лучами, выходящими из отверстия распылителя и оканчива-

ющимися на внешней зоне статического отпечатка, определяется как:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{d - d_p}{l}$$

Для воды, спирта этилового, препаратов «Ингалипт», «Пропосол» с помощью механического клапана АО «Стома» удалось получить статические отпечатки хорошего качества. Так, диаметр рабочей зоны статического отпечатка ( $d$ ) для воды равен 4 см; для спирта — 5 см; для «Ингалипта» — 5.5 см; для «Пропосола» — 5.8 см. (Расстояние до экрана ( $l$ ) равно  $(0.15 \pm 0.005)$  м).

Для препаратов «Каметон» и «Камфомен» статические отпечатки получались неудовлетворительного качества. Рабочая зона отсутствовала, так как жидкость выпускалась струей. Такой же отрицательный результат был получен и при использовании импортного клапана.

Углы распыла  $\alpha$  для воды, спирта этилового, «Ингалипта», «Пропосола», полученные при использовании механического клапана производства АО «Стома» приведены в таблице:

Таблица

	$d^*$ (мм)	$d_p$ , (мм)	$l$ (мм)	$\operatorname{tg} \alpha$	$\angle \alpha$
Вода	40+5	0.45	150	0.2637	15°
Спирт	50+5	0.45	150	0.3303	18.3°-20°
«Ингалипт»	55+5	0.45	150	0.3637	20°-21°
«Пропосол»	58+5	0.45	150	0.3837	21°-22°

\*В таблице даны средние данные из 10 определений диаметра рабочей зоны —  $d$

Как видно из таблицы, при использовании механического клапана производства АО «Стома» для воды, спирта этилового и препаратов на основе воды и спирта этилового были получены длинные факелы распыла с углом от 15° до 22°, обеспечивающие качественное распыление (диаметр рабочей зоны статического отпечатка находится в пределах 40-58 мм).

### Выводы

1. На основании проведенных исследований были изучены основные технологические характеристики клапанно-распылительной системы с механическим насосом производства АО «Стома».

2. Установлено, что отклонение в средней массе одной дозы, выдаваемой механическим клапаном производства АО «Стома», равно  $\pm 10\%$  (для воды);  $\pm 20\%$  (для спирта этилово-

го); для препаратов «Каметон», «Камфомен», «Ингалипт», «Пропосол» это отклонение составляет 15 %-20 %.

3. Размер частиц, выдаваемых клапанно-распылительной системой с механическим насосом производства АО «Стома», не превышает 100 мкм.

4. При использовании механического клапана производства АО «Стома» для воды, спирта этилового, концентратов на основе воды и спирта этилового были получены длинные факелы распыла с углом от 15° до 22°, обеспечивающие качественное распыление (диаметр рабочей зоны статического отпечатка находится в пределах 40-58 мм).

5. На основании полученных результатов изучения клапанно-распылительной системы с механическим насосом производства АО «Стома» были составлены разделы «Технические требования» и «Методы испытания» для ТУ на клапан беспропеллентный с шариком.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Програма припинення в Україні виробництва та використання озоноруйнуючих речовин: Постанова Кабінету Міністрів України від 17 жовтня 1996 року № 1274.
2. Георгиевский В.П., Шакина Т.Н., Хомякова Л.Г., Компанец Е.И., Долейко Н.В., Соловьев Ю.П., Бусыгин С.Б. О замене пропеллентов в медицинских аэрозолях // Фармаком. — 2001. - № 3. - С. 6-8.
3. Башура Г.С., Неугодов П.П., Хаджай Я.И., Теллерман Л.С. Фармацевтические аэрозоли. — М.: Медицина, 1978. — С. 146-155, 251-255.
4. Технология и стандартизация лекарств. Сборник науч. тр. / Под ред. Георгиевского В.П. и Конева Ф.А. — Харьков: РИРЕГ, 1996. — С. 727.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» — 1-е вид. — Харків: РИРЕГ, 2001. — С. 506-507.

### Резюме

Шакина Т.М., Компанец Е.И., Перешивайло Т.М., Хомякова Л.Г., Ефоян А.С., Волков В.В.

### Шляхи вирішення озонної проблеми в галузі виробництва фармацевтичних аерозолів на АТ «Стома»

У статті наведені результати вивчення основних технологічних характеристик нової клапанно-розпилюючої системи з механічним насосом для аерозольних препаратів виробництва АТ «Стома». Установлені параметри визначення середньої маси однієї дози, відтворюваність першої дози, дисперсність, діаметр робочої зони, кут розпилю для води, спирту етилового, препаратів «Інгаліпт», «Каметон», «Камфомен», «Пропосол». На основі одержаних результатів вивчення клапанно-розпилюючої системи з механічним насосом виробництва АТ «Стома» були складені розділи «Технічні вимоги» та «Методи випробування» для ТУ на клапан безпропелентний із кулькою.



*Summary*

Shakina T.N., Kompaneyetz E.I., Pereshivaylo T.N., Khomyakova L.G., Yefoyan A.S., Volkov V.V.

**Approaches to ozone problem solution in the field of pharmaceutical aerosols production at the AO «Stoma»**

In this article the results of study of main technological characteristics of the new valve-spray system with mechanical pump for aerosol products manufacture at AO «Stoma» are presented. The parameters of a single dose average mass determination, first dose repeatability, dispersibility, diameter of working area, spray angle for water, ethyl alcohol, concentrates of «Ingalipt», «Cameton», «Camfomen» and «Proposol» products were established. Basing on the results of valve-spray system with mechanical pump manufactured at AO «Stoma» study the sections «Technical requirements» and «Test methods» for specifications on the propellant-free ball-valve were formed.

**Шакина Татьяна Николаевна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1985). Канд. фарм. наук (1992).

**Компанеец Евгений Иванович** (р. 1956). Окончил Харьковский фармацевтический институт

(1983). Работает в ГНЦЛС (с 1983). Мл. науч. сотрудник лаборатории медицинских аэрозолей.

**Перешивайло Татьяна Николаевна.** Окончила Кабардино-Балкарский государственный университет (1974). Работает в ГНЦЛС (с 1987). Мл. науч. сотрудник лаборатории медицинских аэрозолей.

**Хомякова Людмила Геннадиевна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1985). Работает в ГНЦЛС (с 1985). Мл. науч. сотрудник лаборатории медицинских аэрозолей.

**Ефоян Альберт Степанович** (р. 1932). Окончил Харьковский политехнический институт (1956). Работает на АО «Стома» (с 1958). Главный инженер.

**Волков Владислав Валентинович** (р. 1963). Окончил Харьковское высшее военное командно-инженерное училище (1985). Помощник президента АО «Стома» по внешнеэкономическим связям, маркетингу и сбыту.

УДК 615.453.6:615.243].012

Чепелюк В.И.

**Разработка промышленных технологий получения таблеток с гастрорезистентным покрытием**

Исследованы промышленные технологии получения таблеток натрия диклофенака и индометацина с гастрорезистентным покрытием. Определены критические параметры увлажнения и грануляции и их влияние на качество таблеток. Найден технологические параметры процесса покрытия таблеток пленкой из ойдрагита L100.

В номенклатуре твердых лекарственных форм таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, занимают важное место. Эта форма обеспечивает многим субстанциям оптимальную программу высвобождения из лекарственной формы, практически полностью защищая лекарственное вещество от воздействия желудочного сока и высвобождая его в кишечнике в зависимости от условий биотрансформации в течение различного времени - от нескольких минут до нескольких часов. Таблетку-ядро и пленку оболочки нельзя рассматривать обособленно. Они являются взаимозависимыми компонентами терапевтической системы - гастрорезистентной твердой лекарственной формы. Взаимосвязь обусловлена тем, что, с одной стороны, адгезивность и пористая структура пленки зависят от свойств ядра, а высвобождение, влагонепроницаемость и структура поверхностных капилляров ядра зависят от свойств пленкообразующего раствора [1].

Поэтому при разработке промышленных технологий кишечнорастворимых таблеток

технологические параметры и их критические значения отличаются от параметров таблеток без оболочки и таблеток, покрытых декоративной оболочкой.

Целью настоящей работы является разработка и определение критических параметров промышленных технологий таблеток индометацина и таблеток натрия диклофенака, относящихся к группе нестероидных противовоспалительных средств. Роль оболочки в этих препаратах - уменьшить или устранить возможное ulcerогенное действие субстанций. В некоторых странах, в том числе и в Украине, твердые лекарственные формы этих препаратов производятся без соответствующей ulcerогенной защиты, что является недопустимым для таблеток из этих субстанций.

Для пленочных оболочек таких препаратов применяют ойдрагит [2].

**Экспериментальная часть**

Лабораторные технологии, разработанные в ГНЦЛС, основаны на применении в

качестве кишечнорастворимых покрытий пленок из ойдрагита марки L-100 и таблеток-ядер, в которых используются композиции из известных в таблеточном производстве вспомогательных веществ.

Практика таблеточного производства показывает, что при масштабировании лабораторных разработок в производственных условиях часто возникают существенные изменения технологического процесса, обусловленные различием технологического оборудования и, вследствие этого, различием механических и физико-химических воздействий на частицы порошковой массы и растворов полимеров.

Содержание натрия диклофенака и индометацина в таблетках составляет 25 % и 23 %, соответственно.

Для определения возможности расслоения порошков при сухом смешивании в смесителе СМ-200 мы изучили различия в соответствующих технологических свойствах субстанций и вспомогательных веществ. Результаты приведены в Табл. 1.

Как видно из Табл. 1, отличия технологических свойств действующих веществ не настолько велики, чтобы применять дополнительные технологические работы по предотвращению расслоения. Количественные соотношения вспомогательных веществ между собой и действующими веществами также не требуют дополнительных операций при сухом смешивании и увлажнении.

При промышленном освоении технологии выбор режимов увлажнения и порядка введения разрыхлителя почти всегда нуждается в корректировке, особенно для получения таблеток-ядер, т.к. от этих параметров зависит истираемость таблеток-ядер и, соответственно, качество покрытия [3]. Мы провели эти исследования в опытно-промышленных условиях, используя смеситель емкостью 10 кг и таблеточный пресс РТМ-12. Параметры работы этого оборудования близки к условиям промышленного оборудования на ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье». Выбор режимов проводился методом планирования эксперимента. Использовался метод крутого восхождения с применением полуреплики 2<sup>4</sup> (ПЭФ). Условия варьирования переменных приведены в Табл. 2.

Качество таблеток оценивалось по истираемости таблеток-ядер и распадаемости.

План и результаты эксперимента представлены в Табл. 3, 4.

По данным крутого восхождения, представленным в Табл. 3, 4, выбраны оптимальные режимы влажной грануляции, приведенные в Табл. 5.

На истираемость таблеток-ядер и распадаемость таблеток оказывает большое влияние остаточная влага таблетки. Эти значения обеспечивают получение таблеток-ядер с истираемостью (99.6 ± 0.1) % и распадаемостью - до 30 мин.

Таблица 1

**Технологические свойства порошков**

Название вещества	Прессуемость, кг	Сыпучесть, г/сек	Объемная плотность, г/см <sup>3</sup>
<b>Натрия диклофенак</b>	5.0	1.2	0.6
<b>Индометацин</b>	3.0-3.85	5.0-5.5	0.87-0.88
Крахмал картофельный (отеч.)	0.5	1.6	0.55
Сахар рафинад	8.0	0.9	0.70
Лактоза (отеч.)	3.5	7.0	0.65

Таблица 2

**Уровни варьирования переменных**

Параметры технологического процесса	Нижний		Средний		Верхний	
	натрия диклофенак	индометацин	натрия диклофенак	индометацин	натрия диклофенак	индометацин
Время увлажнения, мин	15	15	20	26	25	25
Количество увлажнителя, %	10	20	12.5	22.5	15	25
Концентрация увлажнителя, %	8	5	10	6	12	7
Количество разрыхлителя в грануляте, %	10	30	30	50	50	70

Таблица 3

## План и результаты эксперимента по натрия диклофенаку

Номер опыта	Время увлажнения, мин	Количество увлажнителя, %	Концентрация увлажнителя, %	Количество разрыхлителя в грануляте, %	
1	+	-	+	-	99.0
2	+	+	-	-	99.1
3	+	-	-	+	98.6
4	+	+	+	+	98.8
5	-	-	+	-	99.5
6	-	+	+	-	99.2
7	-	-	-	+	99.3
8	-	+	-	+	98.7
Коэффициенты регрессии (b)	- 0.25	- 0.15	+ 0.025	- 0.225	
9	0	0	0	0	99.0
10	0	0	0	0	99.2
11	0	0	0	0	99.2
					9.16
Шаг движения $b_i$	- 1.25	0	0	5	
Реализованные опыты	14.5	10.2	5	96	
	15	10	0	-97	
	15	10	0	-97.8	
	15	10	0	96.1	

Таблица 4

## План и результаты эксперимента по индометацину

Номер опыта	Время увлажнения, мин	Количество увлажнителя, %	Концентрация увлажнителя, %	Количество разрыхлителя в грануляте, %	
1	+	-	+	-	92
2	+	+	-	-	86
3	+	-	-	+	90
4	+	+	+	+	93
5	-	-	+	-	92
6	-	+	+	-	90
7	-	-	-	+	94
8	-	+	-	+	86
Коэффициенты регрессии (b)	- 0.0125	- 0.1675	+ 0.1375	+ 0.0375	
9					
10	0	0	0	0	99
11	0	0	0	0	99.1
12	0	0	0	0	99.1
Шаг движения $b_i$	0	0.45	0.14	0	
Реализованные опыты	0	- 0.25	+ 0.25	0	99.3
	0	- 0.5	+ 0.5	0	99.5
	0	- 1	+ 1	0	99.6
	0	- 1	+ 1	0	99.7

Таблица 5

## Режимы влажной грануляции

	Натрия диклофенак	Критическое значение	Индометацин	Критическое значение
Время увлажнения, мин	15	± 5	20	± 5
Количество увлажнителя, %	13.0	+ 2.0	20.0	± 2.5
Концентрация увлажнителя, %	10.0	+ 2.0	7.0	- 1.0
Количество разрыхлителя в составе гранул, %	0	—	50.0	—

Таблица 6

## Показатели качества препаратов Таблетки ортофена, 0.025 г, покрытые оболочкой и Таблетки индометацина, 0.025 г, покрытые оболочкой

	Распадаемость (0.1 M раствор кислоты хлористоводородной)	Распадаемость (буферный раствор рН 6.8 или раствор натрия гидрокарбоната)	Сопутствующие примеси, % от номинального содержания действующего вещества	Растворение, % от номинального содержания действующего вещества в одной таблетке	Количественное содержание действующего вещества в одной таблетке, г
<b>Таблетки ортофена (натрия диклофенака), 0,025 г, покрытые оболочкой</b>					
Фармакопея Британии, 2001	не должны распадаться в течение 2 ч	в буферном растворе должны распадаться в течение не более 60 мин	не более 0.5 % суммы примесей, не более 0.2 % отдельной примеси	-	± 10 % от номинального содержания
ФС 42У-7/84-1074-01	не должны распадаться в течение 2 ч	в растворе натрия гидрокарбоната должны распадаться в течение не более 60 мин	не более 1.0 % суммы примесей, не более 0.3 % отдельной примеси	не менее 75 % (среда растворения - фосфатный буферный раствор)	0.023 – 0.027 (± 7.5 % от номинального содержания)
сер. 10799	соотв.	7 мин	менее 0.5 % суммы примесей, менее 0.2 % отдельной примеси	95	0.0253
сер. 20799	соотв.	4 мин	менее 0.5 суммы примесей, менее 0.2 % отдельной примеси	97	0.0248
сер. 30799	соотв.	9 мин	менее 0.5 суммы примесей, менее 0.2 % отдельной примеси	89	0.0247
<b>Таблетки индометацина, 0.025 г, покрытые оболочкой</b>					
Фармакопея Британии, 2001	не должны распадаться в течение 2 ч	в буферном растворе должны распадаться в течение не более 60 мин	-	-	± 10 % от номинального содержания
ВФС 42У-4-7/84-308-96	не должны распадаться в течение 2 ч	в растворе натрия гидрокарбоната должны распадаться в течение не более 60 мин	не более 0.5 % 4-хлорбензойной кислоты, не более 0.5 % отдельной неидентифицированной примеси	не менее 75 % (среда растворения фосфатный буферный раствор)	0.023 – 0.027 (± 7.5 % от номинального содержания)
сер. 10299	соотв.	14 мин	менее 0.1 % 4-хлорбензойной кислоты, неидентифицированных примесей – 2, менее 0.1 % каждой	88	0.0249
сер. 20299	соотв.	12 мин	отсутств. 4-хлорбензойная кислоты, неидентифицированной примеси – 1, менее 0.2 % каждой	92	0.0253
сер. 30299	соотв.	8	отсутств. 4-хлорбензойной кислоты, неидентифицированных примесей – 2, менее 0.1 % каждой	97	0.0252

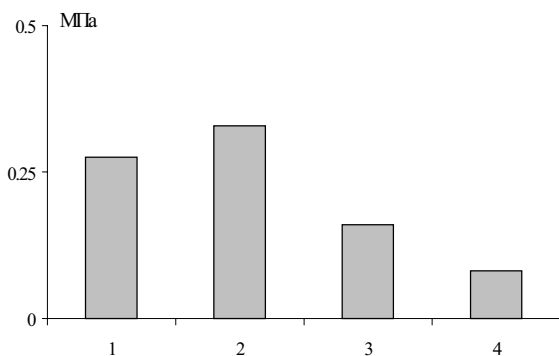
Таблетки-ядра натрия диклофенака и индометацина, наработанные по указанным режимам, имеют одинаковые геометрические и физико-механические параметры: диаметр и высоту, среднюю массу, истираемость таблеток-ядер и распадаемость. Т.к. требования к таблеткам с кишечнорастворимым покрытием для этих препаратов одинаковы, для обоих препаратов может быть использовано одно и то же покрытие, что и было предложено в лабораторных разработках.

Технологические режимы нанесения пленки на ядро определяют качество покрытия, его эффективность и зависят от вязкости пленкообразующего раствора, его текучести, количества суспендированных твердых компонентов и адгезивных свойств поверхности таблеток-ядер.

Для кишечнорастворимого пленкообразующего раствора для этих препаратов, содержащего оидрагит L-100, тальк, полиэтиленоксид, краситель и спирт этиловый, существенно важным является распределение трех групп переменных: давления, температуры и скорости вращения.

Давление сжатого воздуха обеспечивает давление распыления раствора, максимальное давление на раствор, давление на раствор в форсунках. Распределение этих параметров приведено на рисунке.

Рисунок



**Параметры режимов нанесения пленки**

- 1 – давление сжатого воздуха
- 2 – давление распыления
- 3 – максимальное давление раствора
- 4 – показание манометра

Отклонение температуры таблеток от температуры подаваемого воздуха ± 5 %.

Отклонение начальной скорости при нанесении оболочки к производственной скорости 85-90 %.

Масса наносимой оболочки, в пересчете на сухое вещество, 0.01 г (± 10 %).

Полученные с использованием приведенных механических режимов таблетки соответствуют требованиям аналитической нормативной документации (АНД).

Показатели качества приведены в Табл. 6.

На ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье» освоен серийный выпуск таблеток индометацина и натрия диклофенака, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, разработаны и используются производственные и маркетинговые программы, обеспечивающие оптимальный выпуск препаратов.

**Выводы**

Изучено влияние вспомогательных веществ и режимов получения на качество таблеток-ядер натрия диклофенака и индометацина.

Изучены критические параметры технологического процесса производства таблеток, покрытых кишечнорастворимой пленкой из оидрагита L-100.

Установлено соответствие показателей качества таблеток, полученных в промышленных условиях, требованиям ведущих зарубежных Фармакопей.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Silva G.D., Publio M.C.P., Olivera W.P. // Drug Dev. and Ind. Pharm. - 2001. - Vol.27. - № 3. - P. 213-219.
2. Khalil E., Sallam A. // Drug Dev. and Ind. Pharm. - 1999. - Vol. 25. - № 4. - P. 419-427.
3. Lieberman Herbert A., and Lachman L. Pharmaceutical dosage forms: Tablets. Vol.2. - Marcel Dekker, Inc., 1981. - P.185-261.

**Резюме**

Чепелюк В.І.

**Розробка промислових технологій одержання таблеток із гастрорезистентним покриттям**

Досліджені промислові технології одержання таблеток натрію диклофенаку та індометацину з гастрорезистентним покриттям. Визначені критичні параметри зволоження і грануляції та їх вплив на якість таблеток. Знайдені технологічні параметри процесу покриття таблеток плівкою з оидрагіту L100.

**Summary**

Chepelyuk V.I.

**Development of manufacturing technologies of tablets with gastroresistant coating production**

The manufacturing technologies of diclofenac and indometacin tablets with gastroresistant coating production were investigated. The critical parameters of moistening and granulation were determined and the effect of those on tablet quality was demonstrated. The technological parameters of tablet coating with Eudragit L100 film process were found.

УДК 615.22: 615. 453

Слипченко Г.Д.

Государственный научный центр лекарственных средств

### Разработка оптимальных составов и технологий производства препаратов для лечения железодефицитных анемий

Изложены результаты исследований по разработке оптимальных составов и технологий получения двух препаратов для лечения железодефицитных анемий на основе солей железа трехвалентного. Использование совмещенной схемы получения субстанции и лекарственной формы – таблеток позволит получить более экономичное производство.

Особое место среди патологий системы кроветворения занимает железодефицитная анемия (ЖДА).

По имеющимся литературным данным этим заболеванием страдает около 60 % населения всех возрастных групп различных стран, что составляет приблизительно 80 % всех анемий [1].

Поэтому профилактика и лечение ЖДА остается одной из актуальных проблем медицинской науки и практического здравоохранения, что обусловлено обширными функциональными и метаболическими расстройствами, возникающими в организме человека вследствие дефицита железа. Потребность в железосодержащих препаратах непрерывно растет из-за сокращения объема и ассорти-

тимента пищевых продуктов, содержащих железо, и последствий Чернобыльской аварии [2].

Однако ассортимент отечественных противоанемических препаратов в Украине крайне ограничен. Препарат Феррокаль, производства Львовского ХФЗ, сейчас не выпускается, а промышленный выпуск препарата Феррофол, разработанного ГНЦЛС, и препарата Ферроплект не обеспечивают потребности в препаратах, содержащих железо. Препараты этой группы пролонгированного действия вовсе отсутствуют.

Для лечения ЖДА применяют препараты на основе соединений железа двух- и трехвалентного. Соли железа двухвалентного при пероральном применении обладают хорошей

Таблица 1

#### Технологические свойства субстанций железа карбоксиметилцеллюлозы и железа аспарагината

Показатели	Единицы измерения	Железа КМЦ (гранулы)	Железа аспарагинат			
			Субстанция (порошок)	Смесь субстанции с крахмалом картофельным в соотношении:		
				(9 : 1)	(5 : 1)	(3 : 1)
Сыпучесть	г/с	9.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2
Объемная плотность	г/см <sup>3</sup>	0.67 ± 0.1	0.54	0.54	0.55	0.55
Сила выталкивания	мПа	12.0 ± 1.0	24 ± 1.0	18 ± 1.0	14.5 ± 1.0	9.0 ± 1.0
Угол естественного откоса	град	39 ± 2	37 ± 1	36 ± 2	35 ± 1	35 ± 1
Прессуемость (через прочность таблеток)	кг	15 ± 1.0	12.5 ± 0.5	10.4 ± 0.5	8.2 ± 0.5	7.0 ± 0.5
Содержание влаги	%	9.0 ± 0.5	8.5 ± 0.5	9.0 ± 0.5	10.5 ± 0.5	9.5 ± 0.5
Время распадаемости запрессовки	мин	45 ± 1	30 ± 1.0	18 ± 0.2	10 ± 1	2.5 ± 0.5

биодоступностью, но зачастую вызывают диспептические побочные эффекты. Соли железа трехвалентного, подвергаясь окислению и гидролизу на различных участках желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), образуют труднорастворимые полиядерные гидроксидные комплексы разной дисперсности, которые плохо всасываются. Однако, если соли железа трехвалентного провести через пищеварительный канал, не дав им гидролизаться, а гидроксидчастицам - образовать крупные агрегаты, то по эффективности препараты с такими свойствами не будут уступать лекарственным средствам на основе железа двухвалентного и, кроме того, не будут вызывать диспептических побочных явлений, характерных для ферротерапии [3].

По мнению исследователей наиболее перспективными являются железополисахаридные комплексы, которые обладают высокой биодоступностью, крайне низкой токсичностью и хорошей переносимостью. Поэтому для разработки новых оригинальных антианемических препаратов было выбрано соединение на основе железополисахаридов, а также комбинация витаминов с железа аспарагинатом.

#### Материалы и методы исследования

Объектом исследований служили субстанции, синтезированные сотрудниками лаборатории химической технологии лекарственных средств, железа карбоксиметилцеллюлоза и железа аспарагинат, а также вспомогательные вещества отечественного производства.

Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции железа карбоксиметилцеллюлозы показали, что она вполне

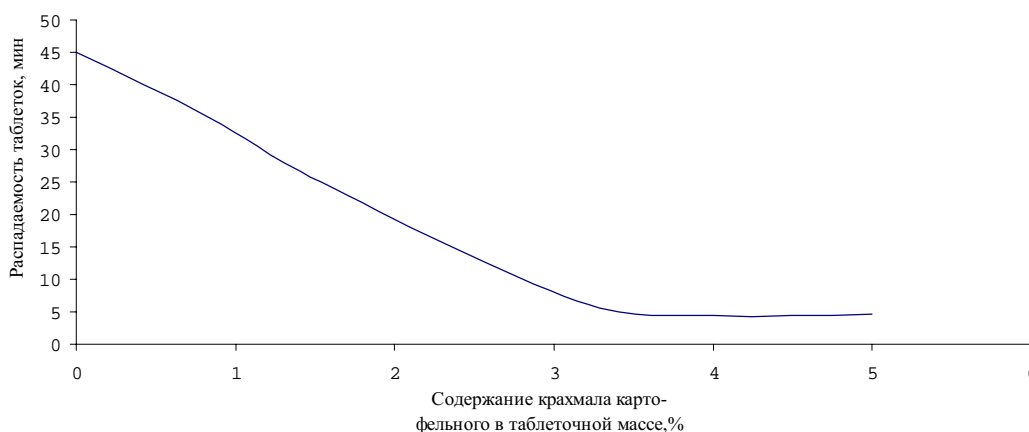
удовлетворяет требованиям, предъявляемым к субстанциям, предназначенным для получения таблеток методом прямого прессования. Как видно из представленных в Табл. 1 данных, основные технологические характеристики железа карбоксиметилцеллюлозы: сыпучесть, прессуемость и сила выталкивания — хорошие. Однако, время распадаемости запрессовки значительное. Поэтому из арсенала отечественных вспомогательных веществ необходимо было выбрать такие, которые бы улучшили этот показатель. Наиболее простым и экономически целесообразным в данном случае является крахмал картофельный.

Известно, что крахмал относится к группе разрыхлителей, действие которых обусловлено не столько набуханием зерен (в воде при температуре 37 °С оно составляет всего 5-10 %), сколько увеличением пористости и созданием условий для проникновения в них жидкости. Поэтому сочетание железа карбоксиметилцеллюлозы, обладающей свойством набухания в воде, в комбинации с крахмалом картофельным позволит снизить время распадаемости лекарственной формы.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Были проведены исследования по определению зависимости распадаемости таблеток от содержания в них крахмала, которые представлены на Рис. 1. Из данных рисунка видно, что введение в состав крахмала картофельного в количестве 1 % от средней массы таблетки уменьшает время распадаемости до 30 мин, 2 % - до 20 мин, 3 % - до 8 мин. Оптимальным содержанием крахмала в таблетке

Рисунок 1  
Зависимость распадаемости таблеток от содержания крахмала картофельного



является 3 %, считая на среднюю массу таблетки.

Иммобилизация железа трехвалентного на полисахаридной матрице обеспечивает его высокую биодоступность благодаря медленному высвобождению лекарственного вещества и более полной его адсорбции в ЖКТ (преимущественно в кишечнике), а также отсутствие раздражающего эффекта на слизистые ЖКТ [4].

Биодоступность препарата была изучена сотрудниками лаборатории фармакологии ферментных препаратов и ингибиторов ГНЦАС в сравнении с препаратами Тардифероном (Швейцария) и Ферроплексом (Венгрия).

Сравнительное изучение показало, что исследуемые таблетки по ряду показателей соответствуют препаратам сравнения и несколько превосходят Тардиферон по показателям содержания гемоглобина и числа эритроцитов [4].

Препарат успешно прошел вторую фазу клинических испытаний. Разработан проект технологического временного регламента совмещенного производства субстанции и таблеток.

На основе комбинации железа аспарагината и витаминов нами были разработаны состав и технология получения еще одного нового оригинального препарата.

Витамины, входящие в состав препарата, оказывают положительное влияние на всасывание железа в ЖКТ, в частности, повышают его внутриклеточный метаболизм и способствуют нормализации биохимических процессов в органах и тканях, а также улучшают биодоступность.

Изучение физико-химических и технологических свойств железа аспарагината, представленных в Табл. 1, показало, что субстанция, представляющая собой мелкодисперсный порошок, обладает очень хорошими показателями прессуемости, однако недостаточной сыпучестью. Сила выталкивания таблетки из матрицы также высока. Это и предопределило введение в состав в качестве вспомогательного вещества крахмала картофельного, обладающего скользящими свойствами, а также разрыхляющим эффектом, что улучшило распадаемость таблеток.

Были проведены исследования по оптимизации содержания крахмала в таблетке. Из данных Табл. 1, видно, что из различных соотношений железа аспарагината с крахмалом

наиболее рациональным является соотношение 3: 1.

Более рациональным оказалось введение вначале 20 % крахмала картофельного во влажную реакционную массу на стадии получения субстанции с последующим гранулированием и сушкой гранулята. Затем остальные 7-10 % вводились на стадии приготовления массы для таблетирования.

Известно, что железо всасывается, в основном, в двенадцатиперстной кишке и в верхнем отделе кишечника. Поэтому препараты железа обычно защищают кишечнорастворимой оболочкой, устойчивой к кислой среде.

С этой целью проводили исследования по созданию кишечнорастворимой формы препарата путем нанесения защитного покрытия на основе сополимеров метакриловой кислоты и метакрилатов Eudragit L 100. Нарботанные образцы исследовались параллельно с таблетками, незащищенными оболочкой. В результате установлено, что аспарагинатный комплекс обладает устойчивостью к разложению в желудочном соке.

Технология получения данной лекарственной формы разработана таким образом, что количество вводимого в состав таблетки крахмала в каждом конкретном случае должно быть пересчитано в зависимости от содержания железа в полученной субстанции и составляет 7-10 % при содержании 16-17 % железа в субстанции. К настоящему времени препарат прошел вторую фазу клинических испытаний, которые показали высокую клиническую эффективность и хорошую переносимость таблеток.

Отличительной особенностью получения данного препарата является совмещение процесса производства субстанции и лекарственной формы, что позволит получить более экономичное производство и низкую себестоимость конечного продукта. Благодаря этому цена препарата будет достаточно приемлемой, что сделает его конкурентоспособным на рынке лекарственных препаратов.

### *Выводы*

На основе отечественных высокоэффективных субстанций с использованием рационального технологического процесса производства разработаны два новых оригинальных препарата, которые пополняют ассортимент противоанемических средств в Украине.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Березенко И.И. Еще раз о железе // Провизор. - 1999. - № 9. - С. 34.
2. Глузман Д.Ф. Подходы к изучению лейкозов, связанных с аварией на ЧЭС // Medical Ukraine. - 1996. - № 1. - С. 35-36.
3. Суховецкая Л.Ф. Результаты деятельности Государственного научного центра лекарственных средств по обеспечению здравоохранения Украины препаратами отечественного производства (1992-97 гг.). Сообщение 3. Основные направления, итоги и перспективы создания новых железосодержащих антианемических препаратов // Фармаком. - 1998. - №. 5. - С. 5-9.
4. Голочевская В.И., Кокина Н.В. и др. Лечение железодефицитной анемии тардифероном // Врач. - 1997. - № 11. - С. 16-17.

## Резюме

Сліпченко Г.Д.

**Розробка оптимального складу та технології виробництва препаратів для лікування залізодефіцитних анемії**

Викладені результати досліджень із розробки оптимальних складів та технологій отримання двох препа-

ратів для лікування залізодефіцитних анемії на основі солей заліза тривалентного. Використання суміщених схем отримання субстанцій та лікарської форми – таблеток дозволить отримати більш економічне виробництво.

## Summary

Slipchenko G.D., SSCD

**Development of optimal compositions and techniques of preparations for iron deficiency anemia treatment production**

The results of investigations on development of optimal compositions and technologies of two preparations for iron deficiency treatment on a basis of ferric salts production are presented. The use of combined scheme of the substance and finished dosage form production will allow to get a more efficient manufacture.

**Сліпченко Галина Дмитрівна.** Окончила Национальную фармацевтическую академию Украины (1997). Мл. науч. сотр. отдела таблетированных лекарственных средств ГНЦЛС (1997).

## Рослинні препарати та їх фармакологічна дія

УДК 582.635.3:612.111.44

Антонюк В.О., Рибак О. В.

Інститут біології клітини НАН України, м. Львів

Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького

### Вивчення вуглеводної специфічності лектинів підземних органів ехінацеї пурпурої та рудбекії роздільнолистої

Із подрібнених кореневищ із коренями ехінацеї пурпурої (*Echinacea purpurea* (L.), Moench.) та рудбекії роздільнолистої (*Rudbeckia laciniata* L.) афінною хроматографією на овоальбумін-сефарозі очищені лектини з виходом 133 мг і 150 мг на кг повітряно-сухої сировини, відповідно. Очищені лектини аглютинували еритроцити кролика в мінімальній концентрації 2.5 мкг/мл.  $\alpha$ -Метил-D-маннопіранозид та  $\beta$ -метил-D-галактопіранозид були досить слабкими інгібіторами активності лектинів. Значно кращими інгібіторами активності лектинів були фенільні та нітрофенільні похідні глюкопіранози. Найкращими інгібіторами активності лектинів були яєчний альбумін, фетуїн, оваріомуцини А та Н, а також овомукоїд та асіалоовомукоїд. Припускається, що лектини підземних органів ехінацеї та рудбекії можуть знайти застосування як цито- та гістохімічні реагенти.

Ехінацея пурпура (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) та рудбекія роздільнолиста (*Rudbeckia laciniata* L.) належать до ботанічно близьких родів родини складноцвітих, які походять із Північної Америки [1].

Ще в першій половині ХХ ст. кореневища з коренями ехінацеї були включені до реєстру VIII Національного формуляру Сполучених Штатів Америки та застосовувалися, в основному, як антисептичний засіб при лікуванні виразок, фурункулів та септицемії [2]. На сьогоднішній день ехінацея пурпура є офіційною в багатьох країнах світу і застосовується як неспецифічний стимулятор імунної системи [3]. Як лікарський засіб ви-

користовується настойка ехінацеї, екстракт ехінацеї входить до складу відомого напою "Живчик". Природа імуностимулюючих речовин ехінацеї пурпурої остаточно не з'ясована. Ними можуть бути, як низько- так і високомолекулярні сполуки. Зокрема, заслуговують уваги біологічно активні речовини білкової природи – лектини. Деякі з них є сильними стимуляторами клітин імунної системи і використовуються в лабораторних дослідженнях для стимуляції імунокомпетентних клітин та діагностики ряду захворювань [4,5], інші знайшли застосування в гістохімічних дослідженнях [6], у судово-медичній ек-

спертизи [7] і в розділенні та ідентифікації вуглеводмісних біополімерів [8].

Декілька років тому було виявлено лектини в екстрактах різних органів ехінацеї вузьколистої (*Echinacea angustifolia* DC) [9] та ехінацеї пурпурової [10,11,12], однак, у цитованих роботах відсутні дані щодо специфічності цих лектинів до вуглеводів. У той же час, вуглеводна специфічність є однією з найважливіших характеристик лектинів, вивчення якої дозволяє прогнозувати методи очищення даних лектинів та можливі галузі їх застосування [13].

Метою даної роботи є вивчення вуглеводної специфічності лектинів ехінацеї та рудбекії та розробка методу їх очищення.

### *Матеріали та методи*

Підземні органи ехінацеї пурпурової та рудбекії роздільнолистої заготовляли в період плодоношення на території Львівської області та у ботанічному саду кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського державного медичного університету ім. Данила Галицького.

Свіжозібрані кореневища з коренями ехінацеї пурпурової та рудбекії роздільнолистої подрібнювали за допомогою електром'ясорубки і з одержаного гомогенату видавлювали сік. До одержаного соку додавали тіосечовину в кінцевій концентрації 0.5 % і проводили діаліз проти 0.9 % розчину натрію хлориду з добавкою 0.5 % тіосечовини протягом 10-12 год. Осад, що утворювався, відкидали після центрифугування і лектини концентрували виморожуванням. Для цього розчин ставили в холодильник при температурі  $-1^{\circ}\text{C}$ . У міру замерзання розчину лід відкидали. Коли об'єм кінцевого розчину становив 25 % -15 % від початкового, виморожування припиняли. Гемаглютинуюча активність екстракту після цього зростала у 2-4 рази. Одержаний концентрат використовували для вивчення вуглеводної специфічності та сорбції лектинів на афінних гелях.

Активність лектинів у соку, екстрактах та розчинах визначали за допомогою реакції гемаглютинації у мікропробірках за відомою методикою [14]. Із цією метою використовували еритроцити людини та кролика, як нативні, так і оброблені трипсином [14], однак, при трипсинізації еритроцитів кролика використовували концентрацію трипсину на 30 % нижчу, ніж при трипсинізації еритроцитів людини.

Вуглеводну специфічність лектинів визначали за допомогою реакції пригнічення гемаглютинації вуглеводами та глікопротеїнами. За допомогою ступінчастого розведення вуглеводу визначали його мінімальну концентрацію, яка повністю пригнічує активність лектинів із титром 1:4 [14].

Для характеристики вуглеводної специфічності лектинів було використано: D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, («Союзхимреактив»), рафінозу («Fluka», Швейцарія),  $\alpha$ - і  $\beta$ -метил-D-галактозида, L-рамнозу, целобіозу, 2-ацетамідо-D-галактопіранозид та 2-ацетамідо-D-глюкопіранозид («Chemapol», Чехія), D-маннозу, D-туранозу, L-рибозу (виробництва Братиславського хімічного інституту), мелібіозу,  $\alpha$ -метил-D-маннозид, феніл- $\alpha$ -2-ацетамідо-D-глюкопіранозид, 4-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюко- та галактопіранозиди («Serva», Німеччина), L-фукозу («Koch Light», Великобританія).

Для визначення взаємодії з глікопротеїнами та полісахаридами використовували глікоген печінки свині, овомукоїд та овальбумін тричі перекристалізований («Biolar», Олайн, Латвія), одержували тиреоглобулін бика та людини [15], фетуїн теляти [16], а також інулін [17], галактоманнан із насіння гуньби сінної (*Trigonella foenum graecum* L.) і дріжджовий маннан [18].

Із метою вивчення вуглеводної специфічності лектинів та взаємодії з афінними гелями було досліджено сорбцію лектинів із концентрованого екстракту на афінних сорбентах (Табл. 1).

Для цього 1-2 мл досліджуваного екстракту змішували з таким же об'ємом афінного гелю, попередньо відмитого забуференим фізіологічним розчином. Суміш збовтували протягом 5 хв і потім поміщали в холодильник при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  на 15 хв. Після цього в екстракті визначали гемаглютинуючу активність. Якщо в рідині над гелем аглютинуюча активність зменшувалася в 2 рази за рахунок розведення розчину, це свідчило, що взаємодія з гелем відсутня, зменшення гемаглютинуючої активності у 4 рази свідчило, що 50 % лектину сорбується на гелі; зменшення гемаглютинуючої активності у 8 і 16 разів свідчило про 75 % та 87 %, відповідно, сорбції лектину на гелі і про можливість використання афінних сорбентів для очищення лектинів.

Після вибору афінного сорбенту очищення лектинів здійснювали таким чином.

Таблиця 1

**Вивчення сорбції лектинів кореневищ із коренями рудбекії роздільнолистої та ехінацеї пурпурової на афінних сорбентах**

Гель	% сорбції на афінному гелі	
	лектини рудбекії	лектини ехінацеї
овогель	87 %	75 %
гідролізована сефароза	-	-
іммобілізований галактоманнан насіння гуньби сінної	-	-
сефадекс G-100	-	-
гуміарабік	-	-
тиреоглобулін-сефароза	50 %	50 %
овомуцин	87 %	50 %
овоальбумін-сефароза	92 %	75 %

*Примітки:*

овогель – афінний гель, одержаний у результаті поперечного зшивання водорозчинних глікопротеїнів яєчного білка;

овомуцин - афінний гель, одержаний у результаті поперечного зшивання водонерозчинних глікопротеїнів яєчного білка;

гуміарабік - афінний гель, одержаний у результаті поперечного зшивання гуміарабіку;

тиреоглобулін-сефароза та овоальбумін-сефароза – афінні гелі, одержані в результаті іммобілізації тиреоглобуліну бика та яєчного альбуміну на сефарозі 4В. У роботі використовували трипсинізовані еритроцити кролика.

Початковий титр гемаглютинації екстрактів - 1:16.

30 г подрібнених на електром'ясорубці повітряно-сухих кореневищ із коренями рудбекії та ехінацеї окремо екстрагували 300 мл 1 % розчину натрію хлориду протягом 1 год при кімнатній температурі, постійно перемішуючи. Екстракт видавлювали крізь щільну тканину і центрифугували протягом 10 хв зі 6000 g для видалення твердих часточок. Освітлений екстракт наносили на колонку з підготованим афінним сорбентом (овоальбумін-сефароза) об'ємом 50 см<sup>3</sup>. Швидкість протікання через колонку підтримували на рівні 5 мл/хв. Після проходження екстракту через колонку її промивали 0.2 М ацетатним буферним розчином рН 6.4, поки екстинція рідини ( $\lambda = 280$  нм), що витікала з колонки, не зменшувалася до 0.15. Сорбований на колонці лектин елюювали за допомогою 1 % розчину кислоти оцтової. Фракції, що містили білок, об'єднували і лектин висолювали амонію сульфатом (600 г/л). Осад концентрували центрифугуванням. Після діалізу проти води дистильованої осад, що утворювався, відкидали і надосадову рідину ліофільно висушували.

*Результати та обговорення*

Гемаглютинуюча активність екстрактів кореневищ із коренями, насіння та соку з надземних частин вищезазначених видів рослин є невисокою. Лише еритроцити кролика, оброблені трипсином, аглютинуються в титрі 1:4-1:8, але при зберіганні розчину вона швидко знижується. Еритроцити людини (нативні та оброблені трипсином) свіжими екстрактами не аглютинуються. Доведення рН екстрактів до 4.0 та висолювання амонію сульфатом не призводить до концентрування лектинів, а навпаки, знижує гемаглютинуючу активність на 80-90 %. Тому концентрування лектинів проводили виморожуванням розчинів. Титр гемаглютинації з нативними еритроцитами кролика зростав до 1:4-1:8, а з трипсинізованими еритроцитами - до 1:16 – 1:32, що достатньо для попереднього вивчення вуглеводної специфічності та вивчення сорбції на афінних гелях.

Взаємодію концентрованих екстрактів рудбекії та ехінацеї вивчали з афінними сорбентами, наведеними в Табл. 1.

В результаті дослідження було встановлено, що кращим афінним сорбентом (із наявних у нас) для очищення лектинів ехінацеї та рудбекії може бути овоальбумін-сефароза, який і було використано.

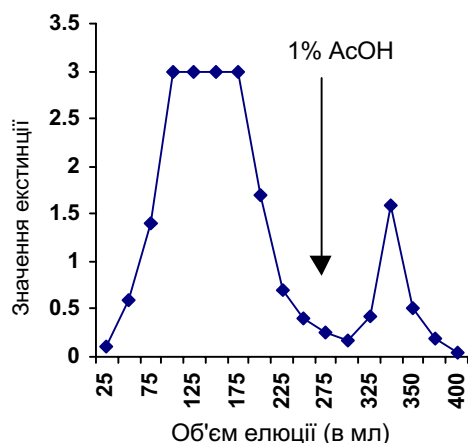
Профіль елюції лектинів рудбекії роздільнолистої з колонки афінного сорбенту представлений на Рис. 1. Профіль елюції лектинів ехінацеї пурпурової аналогічний.

Очищений афінною хроматографією білок ліофільно висушували. Із 30 г повітряно-сухих кореневищ із коренями було одержано 4.5 мг ( $\pm 20$  %) очищених лектинів рудбекії роздільнолистої та 4 мг ( $\pm 20$  %) лектинів ехінацеї пурпурової, що складає близько 150 мг і 133 мг на кг повітряно-сухої сировини, відповідно.

На відміну від екстрактів, розчини очищених афінною хроматографією лектинів стійкі і не знижують гемаглютинуючу активність при тривалому зберіганні (при температурі + 4 °С у присутності 0.1 % розчину натрію азиду як консерванта).

Результати вивчення вуглеводної специфічності лектинів кореневищ із коренями рудбекії та ехінацеї представлені в Табл. 2 та 3.

Рисунок 1



#### Очищення лектинів *Rudbeckia laciniata* L. на афінному сорбенті (профіль елюції)

Таблиця 2

**Взаємодія очищених лектинів кореневищ із коренями рудбекії роздільнолистої та ехінацеї пурпурової з низькомолекулярними вуглеводами**

Низькомолекулярний вуглевод	Мінімальна концентрація низькомолекулярного вуглеводу, що пригнічує активність 4 од. лектинів (у мМ)	
	лектини кореневища ехінацеї	лектини кореневища рудбекії
$\alpha$ -метил-D-маннопіранозид	100	100
лактоза	100	-
$\beta$ -метил-D-галактопіранозид	100	100
2-ацетамідо-2-дезоксид-D-галактопіранозид	100	50
мальтоза	100	50
феніл- $\alpha$ -2-ацетамідо-D-глюкопіранозид	3	1.5
4-нітрофеніл- $\beta$ -2-ацетамідо-D-глюкопіранозид	5	5

#### Примітка.

Лектини обох видів не взаємодіяли з такими вуглеводами в концентрації 0-100 мМ:  $\alpha$ -метил-D-глюкопіранозид, D-глюкоза, L-фукоза, D-манноза, D-фруктоза, L-рамноза, D-галактоза,  $\alpha$ -метил-D-галактопіранозид, 2-ацетамідо-2-дезоксид-D-глюкопіранозид, тураноза, раффіноза, целобіоза, сахароза, 4-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид, D-глюкозамін г/х.

Одержані результати свідчать, що лектини досліджуваних видів рослинної сировини мають подібну вуглеводну специфічність. У діапазоні концентрацій 0-100 мМ лектини досліджуваних видів сировини не взаємоді-

ють із багатьма моносахаридами, що найчастіше використовуються для тестування лектинів (L-фукоза, D-манноза, D-галактоза, D-глюкоза, L-рамноза тощо). Метил- $\alpha$ -D-маннопіранозид (але не метил- $\alpha$ -D-глюкопіранозид та метил- $\alpha$ -D-галактопіранозид) слабо взаємодіє з лектинами. Заміщення гідроксилу у 2-му положенні галактопіранозильного циклу на 2-ацетамідний залишок та заміщення гідроксилу в 1-му положенні глюकोпіранозильного циклу на фенільний або нітрофенільний радикал покращують взаємодію вуглеводу з обома лектинами. При цьому, мабуть,  $\alpha$ -похідні краще взаємодіють із лектинами, ніж відповідні  $\beta$ -похідні. На жаль, у нас був відсутній повний набір  $\alpha$ - і  $\beta$ -аномерів і тому чітко показати це не було змоги.

Таблиця 3

**Взаємодія очищених лектинів кореневищ із коренями рудбекії роздільнолистої та ехінацеї пурпурової з глікопротеїнами та полісахаридами**

Глікопротеїн або полісахарид	Мінімальна концентрація глікопротеїну або полісахариду, що пригнічує активність 4 од. лектинів (у %)	
	лектини кореневища ехінацеї	лектини кореневища рудбекії
глікоген свині, 1 %	-	1 %
дріжджовий маннан, 1 %	-	0.125 %
інулін	-	0.125 %
тиреоглобулін бика	0.5 %	0.5 %
оваріомуцин Н	0.002 %	0.002 %
оваріомуцин А	0.001 %	0.001 %
овомукоїд	0.002 %	0.001 %
асіалоовомукоїд	0.0005 %	0.0005 %
яєчний альбумін	0.125 %	0.06 %
фетуїн	0.125 %	0.125 %
трансферин	0.5 %	0.5 %

#### Примітка:

Лектини обох видів не взаємодіяли з такими глікопротеїнами та полісахаридами: орозомукоїд 1 %, імуноглобулін G 1 %, полісахарид *Trigonella foenum graecum* L., 1 %.

Помічені також деякі відмінності у взаємодії двох лектинів із вуглеводами. Лектини кореневища рудбекії у порівнянні з лектинами ехінацеї мають дещо вищу афінність до дріжджового маннану, яєчного альбуміну та поліфруктозану інуліну.

Аналізуючи одержані результати можна припустити, що лектини обох видів краще взаємодіють зі складними олігосахаридними ланцюгами, що зустрічаються у складі поліса-

харидів та глікопротеїнів, ніж із простими вуглеводами. Найкращим інгібітором активності цих лектинів виявився овомукоїд. Останній містить переважно N-гліканні ланцюги, у складі яких до 25 % 2-ацетамідо-D-глюкопіранозиду, який зв'язаний із D-маннозою, D-галактозою та N-ацетилнейраміновою кислотою [19]. Відщеплення N-ацетилнейрамінової кислоти від овомукоїду підвищує його афінність до лектину в 2-4 рази (Табл. 3). Висока афінність до феніл- $\alpha$ -2-ацетамідо-D-глюкопіранозиду та до глікопротеїду овомукоїду, який містить у складі цукрових ланцюгів велику кількість 2-ацетамідо-D-глюкопіранозидних залишків, дозволяє припустити, що лектини обох видів можна віднести за прийнятою в лектинології класифікації до групи маннозоспецифічних, проте вони відрізняються від лектинів однодольних [20] та дводольних, зокрема від лектинів родини бобових [21], яких також відносять до цієї групи.

Лектини рудбекії та ехінацеї не виявляють групової специфічності до еритроцитів людини, отже, не виявляють селективності до аномерів D-галактози та 2-ацетамідо-D-галактопіранозиду. Вони значно краще аглютинують еритроцити кролика, на поверхні еритроцитів якого залишки D-маннози виражені краще, ніж у людини.

Очевидно, що лектини ехінацеї та рудбекії, маючи високу афінність до складних вуглеводних структур, які зустрічаються у біологічних мембранах, а також виявляючи достатню селективність, можуть знайти застосування як цито- та гістохімічні реагенти.

Крім того, результати взаємодії лектинів із вуглеводами свідчать, що афінними сорбентами для обох лектинів можуть бути імібізовані овомукоїд, трансферин, яєчний альбумін або фетуїн.

Одержані ліофільно висушені препарати лектинів виявляють високу гемаглютинуючу активність. Так, 1 % розчини лектинів рудбекії та ехінацеї аглютинували еритроцити кролика в титрі 1:4096. Іншими словами, мінімальна гемаглютинуюча концентрація лектинів (для еритроцитів кролика) складає 2.5 мкг/мл.

### Висновки

1. Розроблений метод очищення лектинів кореневищ із коренями ехінацеї пурпурової (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) та рудбекії роздільнолистої (*Rudbeckia laciniata* L.) за допомогою афінної хроматографії. Як афінний сорбент використано овоальбумин-сефарозу.

Вихід очищених лектинів становив близько 133 мг і 150 мг, відповідно, на кг повітряно-сухої сировини.

2. Лектини вищезазначених видів краще взаємодіють зі складними олігосахаридними ланцюгами, що зустрічаються у складі полісахаридів та глікопротеїнів, ніж із простими вуглеводами. Найкращими інгібіторами активності цих лектинів виявилися овомукоїд та асіалоовомукоїд. Інгібують активність лектинів також яєчний альбумин, фетуїн, оваріомуцини А та Н.

3. Лектини ехінацеї та рудбекії мають високу афінність до складних вуглеводних структур, які зустрічаються у біологічних мембранах, а також виявляють достатню селективність, і тому можуть знайти застосування як цито- та гістохімічні реагенти.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Рибак О.В. Рослини родів *Echinacea* L. Moench та *Rudbeckia* L., їхній хімічний склад і біологічні властивості // Ліки України. - 2000. - № 1-2. - С. 42-44.
2. H.W. Youngken. Textbook of Pharmacognosy - Philadelphia-Toronto: The Blakiston company, 1948. - 1064 p.
3. Мамчур Ф.І., Зузук Б.М., Василішин А.А. Хімічний склад і фармакологічні властивості рослин роду *Echinacea* (Asteraceae) // Фармацевтичний журнал. - 1993. - № 2. - С. 38-41.
4. Mody R., Joshi S., Chaney W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. - 1995. - V. 33, No. 1. - P. 1-10.
5. Pusztai A. Plants Lectins. - Cambridge: University Press, 1991.
6. Dullmann J., Feldhaus S., Van Damme E.J., Peumans W.J., Schumacher U. Lectin histochemistry of the spleen. A new lectin visualizes the stromal architecture of white pulp and the sinuses of red pulp // J. Histochem. Cytochem. - 2000. - V.48, No.7. - P. 923-932.
7. Луцик М.Д., Антонюк В.А. Приготовление реагента анти-А из лектина горошка мохнатого для выявления антигена А в эритроцитах и слюне человека // Суд.-мед. экспертиза. - 1995. - № 1. - С. 17-19.
8. Peumans W.J., Van Damme E.J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. - 1998. - V.33, No.3. - P 209-258.
9. Поспелов С.В., Самородов В.Н. Поиски и свойства лектинов эхинацеи пурпурной // Проблемы лікарського рослинництва: Тез. доп. міжнар. наук.-практ. конф. із нагоди 80-річчя інституту лікарських рослин УААН. - Полтава, 1996. - С. 239-240.
10. Поспелов С.В. Лектины эхинацеи пурпурной - поиск, свойства и оценка активности // Изучение и использование эхинацеи: Материалы междунар. конф. - Полтава, 1998. - С. 90-92.
11. Поспелов С.В. Оценка активности лектинсодержащих экстрактов эхинацеи пурпурной // Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту. - 1998. - № 1. - С.15-17.
12. Погоріла Н.Ф., Меншова В.О., Брайон О.В., Восводіна О.В., Погоріла З.О., Бродовська І.В. Лектини - біологічно активні речовини ехінацеї пурпурної // Фарм. журнал. - 1997. - № 4. - С. 80-83.

13. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа, 1981 — 156 с.
14. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А. и др. Методы исследования углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. — Львов, 1983. - 20 С.
15. Salvatore G., Salvatore M., Cahnman H. et al. Separation of thyroid iodoproteins by gel filtration and density gradient centrifugation // J. Biol. Chem.-1964. - V. 239, No.10. - P.3267-3274.
16. Deutsch H.F. Fetuin: a mucoprotein of fetal calf serum // J. Biol. Chem.- 1954. - V. 208, No. 2. - P. 669-678.
17. Лазурьевский Г.В., Терентьева И.В., Шамшури А.А. Практические работы по химии природных соединений. - М.: Высшая школа, 1966. - 336 с.
18. Методы химии углеводов. / Под ред. Кочеткова Н.К. — М.: Мир, 1967. - 512 с.
19. Гликопротеины. - Т. 2 / Под ред. А. Готтшалка. - Пер. с английского. — М: Мир, 1969. — С. 20-24.
20. Barre A., Van Damme E.J., Peumans W.J., Rouge P. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins // Plant Physiol. - 1996. - V. 112, No. 4.- P.1531-1540.
21. Rini J.M..Lectin structure //Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. - 1995. - V.24.- P. 551-577.

#### Резюме

Антонюк В.А., Рыбак О.В.

#### Изучение углеводной специфичности лектинов подземных органов эхинацеи пурпурной и рудбекии раздельнолистной

Из измельченных корневищ с корнями эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) и рудбекии раздельнолистной (*Rudbeckia laciniata* L.) аффинной хроматографией на овоальбумин-сефарозе очищены лектины с выходом около 133 мг и 150 мг на кг воздушно-сухого сырья, соответственно. Очищенные лектины агглютинировали эритроциты кролика в минимальной концентрации 2.5 мкг/мл.  $\alpha$ -Метил-D-маннопиранозид и  $\beta$ -метил-D-галактопиранозид были весьма слабыми ингибиторами активности лектинов. Значительно луч-

шими ингибиторами активности лектинов были фенольные и нитрофенильные производные глюкопиранозы. Хорошими ингибиторами активности лектинов были яичный альбумин, фетуин, овариомуцины А и Н, а также овомукоид и асиалоовомукоид. Предполагается, что лектины подземных органов эхинацеи и рудбекии могут найти применение как цито- и гистохимические реагенты.

#### Summary

Antonyuk V.O., Rybak O.V.

#### Study of lectins from *Echinacea purpurea* and *Rudbeckia laciniata* underground parts carbohydrate specificity

Using an affinity chromatography on ovoalbumin-sepharose two lectins from powdered rhizomes and roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. and *Rudbeckia laciniata* L. Lectins were purified with the yield of 133 mg/kg and 150 mg /kg of air-dried raw materials, accordingly. Purified lectins agglutinated the rabbit erythrocytes in minimal concentration of 2.5 mkg/ml. The  $\alpha$ -methyl-D-mannopyranoside and  $\beta$ -methyl-D-galactopyranoside were rather poor inhibitors of lectins activity. Far better inhibitors of lectins activity were the phenyl- and nitrophenyl-derivatives of glucopyranose. Egg's albumine, fetuine, ovariomucines A and H, as well as ovomucoid and asialoovomucoid were the best inhibitors of lectins. It was assumed that lectins from *Echinacea purpurea* and *Rudbeckia laciniata* underground parts may be used as cyto- and histochemical reagents.

#### Антонюк Володимир Олександрович (н. 1955).

Закінчив Львівський медичний інститут (1977). Канд. фарм. наук. співробітник НДІ біології клітини НАН України. Зав. лаб. "Лектиногест".

#### Рибак Оксана Володимирівна.

Закінчила Львівський медичний інститут (1994). Ст. лаборант кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського державного медичного університету ім. Данила Галицького.

УДК 615:57.075.8

Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М., Герасимова О.О.

Національна фармацевтична академія України

Державний науковий центр лікарських засобів, м. Харків

### Трава гороху посівного – джерело одержання лікарських засобів

Проведено морфолого-анатомічне дослідження трави гороху посівного для розробки АНД. Виявлено основні групи БАР трави, встановлено їх якісний та кількісний вміст. Приведені результати з визначення гепатопротекторних та антиоксидантних властивостей препарату Піфламін, який одержано із трави гороху посівного.

У світовому землеробстві горох відомий близько семи тисячоліть і посідає одне із провідних місць як високоврожайна і високобілкова рослина. Його культура займає понад 66 % площі бобових у всіх регіонах світу. Найбільш поширений в Індії, США, країнах Західної Європи, СНД, Канаді, Австралії, країнах Північної Африки [3].

Горох посівний (*Pisum sativum* L.) — однолітня трав'яниста рослина родини бобових, яка походить із районів Криму, Кавказу, Чорноморського узбережжя, Середньої Азії, Індії, Ірану, країн Центральної Африки, де його до цього часу зустрічають у дикоростучому стані. Господарське значення одержав *P. sativum* L., який поділяють на 4 підвиди: *P. sativum* L. subsp. *sativum*, *P. sativum* L. subsp.

arvense, P. sativum L. subsp. asiaticum та P. sativum L. subsp. transcaucasicum [15]. На території України найбільш поширені численні сорти трьох видів гороху: P. sativum L., P. elatius M.B. та P. arvense L. Дикоростучі види роду Pisum L.: P. arvense L. (г. польовий), P. humile Boiss. (г. приземний), P. elatius M.B. (г. високий), P. formosum Stek (г. красивий), а також культурні види: P. sativum L. (горох посівний), P. abissinicum A.Br. (г. абіссинський) — родина Бобові (Fabaceae / Leguminosae) містять різні групи біологічно активних речовин (БАР), що зумовлює різнобічну фармако-терапевтичну дію [1,2,3,7,9,12,15].

Насіння і трава гороху має багатий хімічний склад, який включає білок (до складу якого входять незамінні амінокислоти), а також вуглеводи, полісахариди, крохмаль, жир, каротин, вітаміни групи В — В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, вітаміни С, РР, К, холін, солі калію, марганцю, фосфору, кальцію.

Відвар насіння і трави виявляє сечогінну дію, сприяє виведенню солей і розчиненню каменів у нирках. Наявність у траві незначної кількості похідних куместану (зокрема, куместролу) і в насінні м-ксилогідроксінону зумовлює естрогенну активність екстрактів. Гідроксикоричні кислоти пригнічують реакції ПОЛ, інгібують цитоліз гепатоцитів, відновлюють жовчоутворення в умовах токсичного та алкогольного гепатитів. При пероральному застосуванні *p*-кумарова кислота у дозі 50 мг/кг викликає у мишей 100 % проти-заплідний ефект [11]. Алантоїн, який було виділено нами раніше зі стебел гороху, має репаративну, протизапальну та протипухлинну дію, а ізофлавоноїди гороху (птерокарпани і куместани) — фунгіцидну активність [14]. Деякі очищені від ліпофільних речовин фракції спиртових екстрактів гороху посівного виявили гіпоглікемічну дію [1,9].

Наявність у насінні гороху лектинів сприяє розсмоктуванню набряків при запальних інфільтраціях, карбункулах і фурункулах. Лектини гороху стимулюють лімфоцити селезінки, що призводить до генерування неспецифічних клітин-кілерів, які пригнічують ріст пухлинних клітин і ушкоджують стінки ракових клітин. Лектини гороху знайшли застосування як дешеві та перспективні реагенти у серології і судовій медицині. Комбінація лектинів із протеолітичними ферментами гороху виявилася ефективною при дії на ряд пухлин [12, 16]. Вміст у насінні і траві великих концентрацій (19-25%) протеїну, що містить

незамінні амінокислоти, які найбільш близькі до білків тваринного походження, робить горох незамінним при анеміях, виснаженнях, синдромі недостатності кишкового травлення й усмоктування [7,15].

На сьогоднішній день культивується декілька сотень сортів гороху посівного, які відрізняються за морфологічною будовою та хімічним складом.

Метою нашого дослідження стало виявлення та вивчення перспективного сорту гороху як джерела біологічно активних речовин для одержання лікарських препаратів.

Проведений нами раніше хеморесурсознавчий аналіз 15 сортів гороху, що районовані в Харківській області (найбільш поширені "Пелюшка", "Степной", "Малахіт", "Урожайний", "Харківський-79", "Харківський-80", "Харківський-85") виявив, що сорт "Харківський-80" може бути цінним джерелом БАР для створення лікарського засобу. Для розробки АНД на сировину нами було встановлено морфолого-анатомічні діагностичні ознаки гороху посівного [9]. Сорт "Харківський-80" став об'єктом нашого дослідження.

Для виділення суми БАР подрібнену сировину екстрагували 80 % етанолом, витяги концентрували до водних залишків, відстоювали, фільтрували та очищали хлороформом від хлорофілу та ліпофільних речовин. Витяги хроматографували на папері "Filtrak" № 11 у двох напрямках: I — *n*-бутанол — кислота оцтова - вода (4:1:2), II — 2 % кислота оцтова. Хроматографічно було виявлено 57 речовин фенольної природи, які віднесені до фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот, гідроксикумаринів, флавонолів, ізофлавонів, куместанів та птерокарпанів. Виявлено азотвмісні сполуки: амінокислоти та алантоїн.

Вміст флавоноїдів коливається від 0.47 % до 1.62 % у період плодоносіння та від 0.9 % до 2.89 % у період цвітіння.

#### *Експериментальна частина*

Речовини для одержання суми БАР із трави гороху посівного екстрагували у лабораторних умовах в апараті типу Сокслет. Для цього 15.0 г подрібненої повітряно-сухої сировини поміщали у паперовий патрон із фільтрувального паперу, заливали 200 мл 80 % спирту етилового і проводили вичерпну екстракцію на киплячій водяній бані протягом 10 год (5-6 зливів). Витяг фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю

250 мл, доводили об'єм розчину 80 % спиртом етиловим до позначки (розчин А).

#### Ідентифікація БАР

Для ідентифікації флавоноїдів використовували ціанідинову пробу по Синоду і по Бріанту, реакцію із 10 % розчином КОН, реакцію азосполучення з діазотованою сульфаниловою кислотою, а також реакції забарвлення флавоноїдів на паперових хроматограмах (пари аміаку, 5 % розчин алюмінію хлориду в етанолі, 5 % водний розчин натрію карбонату та ін.) [4,9,10].

До розчину А у пробірці додавали 3 мл 3 % алюмінію хлориду і спостерігали при фільтрованому УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм зеленувато-жовту флуоресценцію.

Хроматографією в тонкому шарі силікагелю та препаративною хроматографією на папері в різних системах розчинників у вивчених сортах гороху було виявлено не менше 17 флавоноїдних сполук, які було віднесено до флавонів (5), флавонолів (9) та ізофлавоноїдів (3). У результаті вивчення фізико-хімічних властивостей зазначених сполук, аналізу їх УФ-, ІЧ- та ПМР-спектрів, продуктів кислотного, ферментного та лужного гідролізу ідентифіковано флавоноли (апигенін, космосийн, лютеолін, цинарозид та діосметин), флавоноли (кемпферол, кверцетин та їх глікозиди – кемпферол-3,7-диглюкозид, ізокверцитрин, рутин, кверцетин-3-софорозид, кверцетин-3-софорозид-*p*-кумарат, кверцетин-3-софоротриозид, кверцетин-3-софоро-триозид-*p*-кумарат) та похідні птерокарпану та куместану, структура яких встановлюється.

На підставі якісних реакцій та методами тонкошарової (ТШХ), паперової хроматографії, за флуоресценцією у фільтрованому УФ-світлі і величинами  $R_f$  було визначено наявність не менше п'яти гідроксикоричних кислот та трьох гідроксикумаринів, які шляхом порівняння фізико-хімічних властивостей із вірогідними зразками було ідентифіковано з *p*-кумаровою, кавовою, феруловою, хлорогеновою, неохлорогеновою кислотами; а також з умбеліфероном, ескулетином і скополетином, відповідно.

Виявлення вільних цукрів на хроматограмах проводили за допомогою реакцій з анілінфталатним реактивом.

Якісний склад амінокислот встановлювали методом ТШХ на пластинках "Силуфол" у системі розчинників: 96 % спирт-аміаку розчин концентрований, у співвідношенні 7:3. Хроматографування проводили висхідним

способом, як хромогенний проявник використовували розчин нінгідрину, хроматограми витримували в сушильній шафі при температурі 105 °С протягом 5 хв. Хроматографічно виявлено 15 амінокислот, серед них незамінні – треонін, метіонін, валін, лейцин, ізолейцин, лізин, фенілаланін; напівзамінні – гістидин, аргінін; замінні – аспарагінова кислота, глютамінова кислота, серин, гліцин, аланін, цистеїн. Найбільш інтенсивними на хроматограмі виявилися плями аргініну, лізину, глютамінової кислоти та серину,  $R_f \cdot 100$  яких дорівнюють 18, 31, 46, 55, відповідно.

Кількісне визначення флавоноїдів, амінокислот та відновлюючих цукрів проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірювали у кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі СФ-46 за відповідної довжини хвилі [4,5,9,10,13].

Флавоноїди. 3 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 5 мл 2.5 % алюмінію хлориду спиртового, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до позначки і перемішують. Через 30 хв вимірюють оптичну густину одержаного розчину за довжини хвилі 410 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, який містить 3 мл розчину А, доведеного в мірній колбі місткістю 25 мл 96% спиртом до позначки [4,5,9,10].

Вміст суми флавоноїдів ( $X_1$ ) у сировині, у відсотках, у перерахунку на рутин, розраховують за формулою:

$$X_1 = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{215 \times 10 \times m \times (100 - W)} = \frac{D \times 12500}{215 \times m \times (100 - W)},$$

де  $D$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$m$  – маса наважки сировини, у грамах;

215 – питомий показник поглинання ( $E_{1\text{см}}^{1\%}$ ) рутину з алюмінію хлоридом за довжини хвилі 410 нм;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми флавоноїдів у сировині має бути не менше 1.8 %, у перерахунку на рутин.

Відновлюючі цукри. Кількісне визначення цукрів проводили спектрофотометричним методом із використанням ортотолуїдинового реактиву. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 610 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують 80 % спирт. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину, який містить 2.5 мл розчину С3 глюкози, який приготовано ана-



логічно до розчину А із додаванням ортото-луїдинового реактиву.

Вміст суми відновлюючих цукрів ( $X_3$ ) у сировині, у відсотках, у перерахунку на глюкозу, розраховують за формулою:

$$X_3 = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 25 \times 20 \times 2.5 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 100 \times 50 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 100}{D_0 \times m \times (100 - W)},$$

де  $D$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$D_0$  – оптична густина розчину СЗ глюкози;

$m$  – маса наважки препарату, у грамах;

$m_0$  – маса наважки СЗ глюкози, у грамах

$W$  – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми відновлюючих цукрів у сировині має бути не менше 10 %, у перерахунку на глюкозу.

**Амінокислоти.** 1 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 8 мл 0.2 % розчину нінгідрину в спирті ізобутиловому і нагрівають на водяній бані при температурі 80 °С протягом 5 хв. Охолоджують до кімнатної температури, кількісно переносять двома порціями по 5 мл спирту ізобутилового в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину спиртом ізобутиловим до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густина одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 573 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, який містить 8 мл 0.2 % розчину нінгідрину в спирті ізобутиловому і доведений спиртом ізобутиловим у мірній колбі місткістю 25 мл до позначки.

Вміст суми амінокислот ( $X_4$ ) у сировині, у відсотках, у перерахунку на лейцин, розраховують за формулою:

$$X_4 = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{862 \times m \times 1 \times (100 - W)} = \frac{D \times 125000}{862 \times m \times (100 - W)},$$

де:  $D$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$m$  – маса наважки препарату, у грамах;

862 – питомий показник поглинання комплексу лейцину з нінгідрином за довжини хвилі 573 нм;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми амінокислот у сировині, у перерахунку на лейцин, має бути не менше 16%.

Методом лазерної мас-спектрометрії з регістратором на фотоплівку на приладі лазерний мас-спектрометр високого розділення по

Маттеуху-Герцогу МС 3101 із мікрофотометром реєструючим "ИФО-451" були визначені мікроелементи. Дослід проводився в НЦ Харківського фізико-технічного інституту. Виявлено такі макро- і мікроелементи (мас %): В-0.0018; F-0.019; Na-0.4; Mg-0.83; Al-0.0074; Si-0.07; P-0.15; S-0.53; Cl-0.32; K-2.64; Ca-0.19; Mn-0.0017; Fe-0.0043.

**Фармакологічні властивості.** На кафедрі фармакогнозії і в Центральній науково-дослідній лабораторії (ЦНДЛ) НФАУ під керівництвом проф. В.М. Ковальова і Л.В. Яковлевої створено новий препарат гепатопротекторної та антиоксидантної дії Піфламін на основі БАР гороху [1,2]. Для одержання Піфламіну використовується обмолочена трава гороху посівного, яку збирають у фазу кінця цвітіння і початку плодоносіння у стадії молочно-воскової стиглості насіння.

Встановлення гепатопротекторних властивостей проводилося в умовах гострого і хронічного токсичного гепатитів, викликаних токсичним ураженням печінки парацетамолом, тетрахлоретаном і тетрахлорметаном у комбінації з етанолом у дослідах на щурах [6]. Виявлено виражену гепатозахисну дію Піфламіну в дозі 100 мг/кг, яка вважається умовно терапевтичною. За виявом гепатопротекторного ефекту Піфламін перевищує препарат порівняння Силібор і може бути рекомендований для лікування гострих токсичних, лікарських та хронічних гепатитів. Вивчення антиоксидантних властивостей субстанції Піфламін проводили в умовах перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) на інтактних мікросомах із печінки щурів у системі *in vitro*. Піфламін виявився практично безпечним і не викликав побічної дії [2,8].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Фітохімічний і фармакогностичний аналіз показав наявність в траві гороху різних БАР: гідроксикоричних кислот, флавоноїдів (1.8 %), амінокислот (16 %), полісахаридів (10 %), мікроелементів. Характерними флавоноїдними глікозидами для гороху є моно-, ди-, біо- та триозиди кверцетину і кемпферолу, часто ацильовані по третьому і другому цукровому залишку. Флавоноїдні сполуки зарекомендували себе як антиоксиданти і мембраностабілізуючі речовини.

Якісний склад амінокислот трави гороху посівного та препарату Піфламін виявився ідентичним.

За результатами проведених досліджень встановлено, що субстанція Піфламін на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту знижує інтенсивність ураження печінки на 20 %. Силібор у дозі 25 мг/кг на цій моделі знижує ступінь ураження на 18.3 %. Таким чином, одержані дані свідчать про те, що в умовах описаної вище патології субстанція Піфламін у дозі 100 мг/кг виявляє гепатопротекторний ефект на рівні препарату порівняння Силібор.

Субстанція Піфламін є високоефективним антиоксидантом, що не розділяє процеси окиснення та фосфорилювання мітохондрій печінки щурів у системі *in vitro*. Фармакологічну активність препарату зумовлюють поліфенольні сполуки, амінокислоти, полісахариди, що входять до його складу. Антиоксидантні властивості поліфенолів і регенеруючі властивості амінокислот сприяють прискоренню регенерації та відновленню функціональної активності клітин печінки. На моделі хронічного ураження печінки тетрахлорметаном та етанолом встановлено, що субстанція Піфламін у дозі 100 мг/кг виявляє виражений антиоксидантний ефект, покращує показники жовчоутворення в печінці, що забезпечує її гепатозахисну дію.

Отриманий сухий екстракт і таблетки Піфламін - перший і єдиний препарат в Україні - гепатопротектор, який отримано з вітчизняної сировини. Сировинні ресурси для його виробництва значні, горох має найбільшу площу культивування серед сільськогосподарських рослин, які займають в Україні більше 700 тис га. Можливий щорічний збір трави більше 1 млн т. Можливий випуск більше 1 млн упаковок таблеток № 50 по 0.125 г.

### Висновки

1. Фітохімічний і фармакогностичний аналіз показав наявність в траві гороху різних БАР: гідроксикоричних кислот, гідроксикумаринів, флавоноїдів, амінокислот, полісахаридів, мікроелементів. Характерними флавоноїдними глікозидами для гороху є моно-, ди-, біо- та триозиди кверцетину і кемпферолу, часто ацильовані по третьому і другому цукровому залишку.

2. Проведені фармакологічні дослідження сумарного комплексу БАР (сухий екстракт) гороху посівного виявили його антиоксидантну і гепатопротекторну активність.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Ковальова А.М., Яковлєва Л.В., Ковальов В.М., Крєтова І.В. Вивчення біологічно активних речовин гороху посівного // Тез. доп. I Конгресу світової федерації українських товариств. - Львів, 1994. - С. 243.
2. Гордієнко А.Д., Яковлєва Л.В., Ковалева А.М., Кудкоцева О.В. Вплив піфламіну на функціональну активність міросом із печінки щурів // Фармац. журн. - 1996. - № 6. - С. 76-78.
3. Выращивание зернобобовых культур на промышленной основе / Д. Эберт, И. Фокке, В. Клейн и др.: Пер. с нем. и предисловие Е.И. Пономарева. - М.: Колос, 1981. - 160 с.
4. Георгиевский В.П., Гризодуб А.И. Стандартизация и контроль качества лекарственных средств / В сб. научных трудов: Технология и стандартизация лекарств. - ООО "РИРЕГ", 1996. - С. 412-519.
5. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений - Новосибирск: Наука, 1990. - 333 с.
6. Яковлєва Л.В., Чикіткіна В.В., Герасимова О.О., Ковальова А.М., Бунятян Н.Д. Гепатозахисні властивості Піфламіну - поліфенольного препарату з трави гороху посівного // Клінічна фармація. - 1998. - Т. 2, № 1. - С. 71-74.
7. Дудченко Л.Г., Кривенко В.В. Пищевые растения - целители. - 2-е изд., доп. и перераб. - Киев: Наук.думка, 1988. - 272 с.
8. Бунятян Н.Д., Герасимова О.А., Чикиткина В.В., Ковалева А.М., Яковлєва Л.М., Казьмин М.А. Изучение безвредности растительного гепатопротектора пифламина // Фармація. - 1999. - № 1. - С. 53-56.
9. Ковалева А.М. Фармакогностическое изучение рода вика и горох: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. - Харьков, 1988. - 22 с.
10. Король В.В., Ковальов В.М. Дослідження флавоноїдів у траві *Lotus corniculatus* L. // Фізіологічно активні речовини. - 1999. - №1 (27). - С. 99-101.
11. Корхов В.В., Мац М.Н. Растения как потенциальные источники противозачаточных средств // Растит. ресурсы. - Т. XVII, вып.2. - 1981. - С. 293-299.
12. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: "Вища школа", 1981. - 155 с.
13. Растительные лекарственные средства / Максютин Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П. и др./ Под ред. Н.П. Максютинной. - Киев:Здоров'я, 1985. - 280 с.
14. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. - Л.: Наука, 1985. - 336 с.; 1987. - 326 с.
15. Саулит Л.С. Дикорастущие виды гороха в культуре. Автореф. дис. ... канд. биол. наук - Л., 1968. - 16 с.
16. Trowbridge I. Isolation and chemical characterization of metogenin lectin from *Pisum sativum*. // J. Biol. Chem. - 1974. - V. 249, №18. - P. 6004-6012.

### Резюме

Ковалева А.М., Георгиевский Г.В., Комиссаренко А.Н., Герасимова О.А.

### Трава гороха посівного - источник получения лекарственных средств

Определены диагностические признаки морфолого-анатомического строения травы гороха посівного для разработки АНД. Выявлены основные группы БАВ травы, определен их качественный и количественный состав. Приведены результаты по определению гепатопротекторных и антиоксидантных свойств препарата Пифламин, полученного из гороха посівного.

*Summary*

Kovalyova A.M., Georgiyevskiy G.V.,  
Komissarenko A.N., Gerasimova O.A.

**Grass of sowing pea – the source of new medicines obtaining**

To develop the analytical and normative documentation the morphologic-anatomical investigation of sowing pea grass was carried out. The main groups of grass biological active substances were revealed; the qualitative and quantitative composition of ones was determined. The results of determination of hepatic protective and anti-oxidative properties of Piflamin medicine obtained from grass of sowing pea are adduced.

**Ковальова Алла Михайлівна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут. Канд. фарм. наук. Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України.

**Георгієвський Геннадій Вікторович** (н.1969). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1992). Канд. фарм. наук (1995). Ст. науковий співробітник відділу Державної Фармакопеї України ДП "Науково-експертний фармакопейний центр". Зав. лабораторії фізико-хімічних процесів ДНЦЛЗ (2001).

**Комісаренко Андрій Миколайович** (н. 1962). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1984). Доктор фарм. наук (2000). Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України.

**Герасимова О.О.** Закінчила Українську фармацевтичну академію (1998). Аспірантка НФАУ.

УДК 582.632.1:581.144.4:612.46:615.244:615.451.16

Борисенко О.І., Кисличенко В.С., Васильченко Є.О.  
Національна фармацевтична академія України

**Береза бородавчата: фармакотерапевтичні властивості, медичне застосування, власні дослідження впливу настоек на функції нирок**

У наведеному огляді літератури висвітлюється застосування берези бородавчатої (*B. verrucosa* Ehr.) род. березових (*Betulaceae*) в медицині. Широкий спектр лікувальних властивостей обумовлює перспективи створення на основі рослинної сировини берези бородавчатої нових лікарських засобів для нефрології. Власні дослідження стосуються вивчення діуретичної та салуретичної дії 40% (1:5 і 1:10) та 70 % (1:5 і 1:10) настоек листя берези бородавчатої.

Береза бородавчата (*B. verrucosa* Ehr.) род. березових (*Betulaceae*) - добре відоме дерево, поширене по всій території України, типовий представник змішаних лісів більшості європейських країн [42]. У медицині застосовують бруньки, листя, сік берези, а також березовий гриб - чагу. До Фармакопей СРСР включено порошок березового вугілля (I-VII вид.), вугілля активоване (VIII-X вид.), дьоготь березовий (I-VI, VII, IX вид.) [9].

Березове вугілля у вигляді таблеток "Карболен", "Карбовіт" застосовується при отруєннях, захворюваннях шлунково-кишкового тракту, які супроводжуються підвищеною кислотністю, метеоризмом. В умовах екологічної небезпеки перспективними є розробки зі створення з вугілля активованого сучасних ентеросорбентів [30, 32, 42].

Березовий дьоготь входить до складу мазей Вількінсона, Конькова, Вишневського та ін., які застосовуються для лікування ран, екзем, лускатого лишаю та інших шкірних захворювань. Березовий дьоготь у народній медицині застосовують при хворобах горла і бронхітах, а також при туберкульозі легень, циститі катарального походження [5, 31, 32].

Бруньки (БББ) і листя (ЛББ) берези бородавчатої використовують як сечогінні, жовчогінні та дезинфікуючі засоби. Жовчогінні та антимікробні властивості настоїв, відварів ЛББ використовують у комплексній терапії захворювань печінки [21, 36, 43]. Настої й екстракти ЛББ ефективні при легких формах холециститу і холецистоангіохоліту. У хворих втамовується біль, проходить нудота, покращується загальний стан, зменшуються розміри печінки, посилюється сечо- та жовчовиділення [3, 20, 46].

Ефективні ЛББ і БББ при набряках серцевого походження. При серцевій недостатності під дією настоїв, відварів ЛББ і БББ збільшується діурез, зменшується задишка, покращується самопочуття хворих [6, 20, 39].

Завдяки вмісту калію нітрату в ЛББ посилюється діуретична дія флавоноїдів, із організму в більшій кількості виводяться хлориди і сечовина, зменшується альбумінурія [1, 16, 31, 35].

При хронічних нефритах, сечокиислому діатезі ЛББ використовують у вигляді настою, але не рекомендується вживати їх при функціональній недостатності нирок, гострому гломерулонефриті через смолисті речови-

ни, що знайдені у листі і бруньках і що подразнюють ниркову тканину [12, 34, 35, 39].

ЛББ входить до складу препарату "Фітолізин", який застосовують у вигляді водорозчинного гелю для лікування пієлонефриту та інфекцій сечових шляхів [32].

На моделях ексудативного запалення виявлено протизапальну активність ЛББ. Крім того, ЛББ виявляє антисептичні, протигрибкові властивості [24, 41]. Протівірусна активність рослини виражена слабкіше, ніж у інших засобів синтетичного і рослинного походження (Оксолін, Госсипол та ін.) [35].

ЛББ входять до складу зборів, що використовуються як антисептичні і відхаркувальні засоби при респіраторно-вірусних інфекціях, хронічних тонзилітах, гострих і хронічних бронхітах, пневмоніях, бронхіальній астмі, а також при туберкульозі легенів [5, 42, 47].

Встановлено, що водний настій і екстракт із ЛББ весняного збору викликають загибель лямблїї, парамецїї та трихомонад [13, 35].

Настій ЛББ містить багато аскорбінової кислоти і діє як загальнозміцнюючий засіб, виявляє протицинготну активність [22, 38].

Відвар молодого ЛББ застосовують при судомках, нервових розладах [18, 33, 38], тромбофлебїтах [5, 27].

Як засіб, регулюючий функціональну діяльність жіночих статевих органів, відвар ЛББ рекомендують при дісменореї, у післяродовий період [25, 31]. Ванночки і тампони з настоєм ЛББ або БББ застосовують при запальних процесах та ерозїях шийки матки [8, 43]. ЛББ входить до складу зборів, які застосовують при патологічному клімаксі [47].

ЛББ у вигляді настою, відвару, настойки, а також у складі зборів рекомендують для укріплення та стимуляції росту волосся, зникнення лупи, посиленому потінні, гострій екземі, нейродермітах, фурункульозі [40, 49].

Березовий чай із листя і кори вживають при цукровому діабеті [37].

ЛББ і березовий гриб - чага входять до складу зборів, які застосовуються при аденомі передміхурової залози та простатиті [31, 45].

Існує досвід клінічного застосування настою, відвару і настойки БББ при шкірних захворюваннях, зокрема, при лікуванні хворих різними формами екземи. Галенові лікарські форми рослини застосовують зовнішньо для втирання при невралгїйних болях, міозитах, роблять компреси і вживають внут-

рішньо при захворюваннях суглобів, подагрі, артритих, ревматизмі, радикульїті [17, 38, 44].

У Франції масляний екстракт із БББ використовують у вигляді гарячих компресів при скрофульозі [42].

Настій БББ входить до складу косметичних кремів із відбілювальною та протизапальною дією [40, 49].

Сїк берези широко застосовується як загальнозміцнюючий та тонїзуючий засіб. Весняний березовий сїк вживають як кровоочисний засіб при шкірних хворобах (екземі, лишаях, фурункульозі), ангїні, анемії, при ранах, що погано загоюються, виразках, скорбуті, подагрі, захворюваннях суглобів [11, 15, 31]. Березовий сїк у поєднанні із соком молодих листочків берези стимулює роботу нирок, зміцнює ниркову тканину, не подразнює її, на відміну від інших сечогінних засобів [29, 35]. Існують дані про протизапальну, глистогінну дію березового соку. Його п'ють при атеросклерозі, роблять аплїкації при псорїазі, сверблячці [14, 48]. Вмивання березовим соком сприяє зникненню вугрів, пігментних плям [7, 40].

Березовий гриб - чагу використовують як симптоматичний засіб для покращення загального стану онкологічних хворих. Така дія чаги пов'язана із вмістом в ньому великої кількості ароматичних, фенольних і високополїмерних сполук [26]. В офіційній медицині застосовують препарат "Бефунгін" - напівгустий екстракт із наростів гриба. До екстракту додаються солі кобальту хлориду (0.175 %) або кобальту сульфату (0.2 %). Назначають "Бефунгін" хворим із злоякісними пухлинами різної локалізації, а також при хронічних гастритах, атонїї кишково-шлункового тракту, при виразковій хворобі шлунка [2, 19, 28, 43].

Таким чином, лікарські засоби із рослинної сировини берези бородавчастої виявляють різноманїтні фармакологічні властивості та знаходять широке застосування в медицині. При цьому більшість літературних джерел свідчить, що найбільш характерною фармакологічною дією, притаманною лікарським засобам, одержаним із ЛББ та БББ, є вплив на функціональний стан нирок, зокрема діуретична та калїїзберїгаюча активність.

В Україні офіційною рослинною сировиною є лише бруньки берези бородавчастої [10], заготівля яких пов'язана із деякими труднощами. Особливості заготівлі БББ не дозволяють підтримувати ресурсні запаси у

належному стані. ЛББ, яке має таку ж фармакологічну активність, легше заготовляти. Заготівельний процес цього виду рослинної сировини не приносить значної шкоди лісовим масивам. Це спонукало нас до поглибленого фітохімічного та фармакологічного вивчення ЛББ.

Метою даної роботи є вивчення впливу настоек ЛББ на функції нирок.

Фармакологічну активність настоек оцінювали за діуретичною та салуретичною діями у порівнянні з Леспенефрилом – настойкою коренів та листя леспедеци головчатої ("Darsi Pharma", Франція) [4].

*Об'єкти та методи дослідження*

У дослідженнях використовували 40 % (1:5 та 1:10), 70 % (1:5 та 1:10) настоек ЛББ. Функціональну дію настоек вивчали в дослідах на 35 білих щурах-самцях лінії "Вістар" вагою 160-170 г в умовах спонтанного добового діурезу. За 16 год до експерименту тварин лишали їжі, залишаючи вільним доступ до води. Настойки для усунення впливу спирту етилового попередньо упарювали на водяній бані до 1/3 об'єму, доводячи об'єм до початкового водою дистильованою.

Підготовлені таким чином настойки вводили щурам перорально в різних дозах. У контрольних дослідах тварини отримували адекватні кількості води дистильованої. Збір сечі здійснювали в спеціальних індивідуальних обмінних клітинах фірми «Simax» (Словакія). У добовій сечі щурів методом полуменевої фотометрії визначали концентрацію іонів натрію і калію.

Спочатку були проведені дослідження з визначення залежності від дози діуретичної і салуретичної дії 40 % настоек ЛББ у розведеннях 1:5, 1:10 і препарату порівняння Леспенефрил [23, 32].

Наступне поглиблене вивчення впливу настоек на функції нирок здійснювали, застосовуючи їх у встановленій, найбільш ефективній дозі. Статистичну обробку результатів здійснювали за критерієм Ст'юдента.

Одержані при визначенні ефективної дози ЛББ дані наведені у Табл. 1.

*Результати та їх обговорення*

Настойки ЛББ в обох розведеннях чинять залежний від дози діуретичний та натрійуретичний ефекти, які повністю співставимі із впливом препарату порівняння. При цьому встановлені ефекти залежать від способу приготування і виду об'єкту, що вивчається: підвищення концентрації речовин в настойці (розведення 1:5 у порівнянні із розведенням 1:10) призводить до посилення діуретичної та салуретичної дії. Із Табл. 1 видно також, що у максимальній із використаних доз подальшого підвищення дії як настоек, так і Леспенефрилу не спостерігається.

Таким чином, ця частина експериментальних досліджень дозволила в якості дози для подальшого вивчення, що викликає найбільш виражений вплив на видільну функцію нирок, брати дозу 12 мл/кг.

Результати вивчення діуретичної та салуретичної дії ЛББ і Леспенефрилу у дозі 12 мл/кг наведені у Табл. 2 і свідчать, що настойки ЛББ в обох концентраціях та в обох розведеннях підвищують діурез та екскрецію

Таблиця 1  
Залежність діуретичної та натрійуретичної дії настоек листя берези бородавчатої і Леспенефрилу від дози

Умови дослідів	Доза, мл/кг	Кількість дослідів (n)	Ефект (у порівнянні з контролем), %	
			діуретичний	натрійуретичний
Настойка листя берези, 40 %, 1:5	3.0	11	19.5	34.1
	6.0	10	39.0	40.3
	12.0	12	80.2	76.3
	15.0	10	79.5	75.8
Настойка листя берези, 40 %, 1:10	3.0	10	15.7	21.6
	6.0	9	38.7	49.7
	12.0	10	65.0	120.0
	15.0	11	65.2	119.7
Леспенефрил	3.0	8	18.0	30.2
	6.0	9	30.0	55.6
	12.0	11	72.0	132.0
	15.0	10	71.8	132.6

Таблиця 2

Вплив настоек листя берези бородавчастої на функцію нирок щурів ( $M \pm m$ )

Умови дослідів	Діурез, мл	Екскреція $Na^+$ , ммоль/доб	Екскреція $K^+$ , ммоль/доб
Настойка листя берези, 40 %, 1:5 (n=12)	8.38 $\pm$ 0.70	0.603 $\pm$ 0.041	0.514 $\pm$ 0.045
Настойка листя берези, 40 %, 1:10 (n=10)	7.70 $\pm$ 0.95	0.754 $\pm$ 0.035	0.474 $\pm$ 0.026
Настойка листя берези, 70 %, (1:5) (n=13)	4.25 $\pm$ 0.58	0.484 $\pm$ 0.025	0.210 $\pm$ 0.014
Настойка листя берези, 70 %, 1:10 (n=12)	3.98 $\pm$ 0.51	0.462 $\pm$ 0.018	0.227 $\pm$ 0.017
Леспенефрил (n=10)	8.00 $\pm$ 1.50	0.794 $\pm$ 0.052	0.448 $\pm$ 0.025
Контроль (n=33)	3.42 $\pm$ 0.40	0.282 $\pm$ 0.02	0.217 $\pm$ 0.012

електролітів у дослідних тварин. При цьому чітко визначилася залежність цих ефектів як від концентрації настоек ЛББ, так і від їх розведення. Так, у розведенні 1:5 40 % настойка ЛББ підвищує діурез у середньому на 145 % відносно контролю, тоді як у такому ж розведенні ефективність 70 % настойки становить лише 31 %.

Аналогічна картина спостерігається і для 40 % та 70 % настоек у розведенні 1:10, що становить 125 % і 16 %, відповідно. Із Табл. 2 також видно, що діуретичний ефект Леспенефрилу дорівнює 134 % відносно контролю.

Отже, аналогічний Леспенефрилу вплив на функцію нирок чинить 40 % настойка ЛББ у розведенні 1:5.

Наведені у Табл. 2 дані свідчать також, що діуретична дія настоек із листя берези, незалежно від способу екстракції і концентрації в них діючих речовин, відповідає встановленій для Леспенефрилу.

Леспенефрил виявляє салуретичну дію, підвищуючи екскрецію  $Na^+$  і  $K^+$  із сечею тварин. Вираженість салуретичного ефекту в окремих серіях дослідів коливається в межах 114-132 %; каліуретична дія виражена слабкіше і знаходиться у межах 44-83 %. 70 % настойки з листя берези (1:5 і 1:10) також виявляють салуретичну активність, вираженість якої підвищується із збільшенням міцності екстрагенту. Так, натрій- і каліуретичні ефекти 70 % настоек у 1.5-1.7 разів більше, ніж у 40 % настоек.

Відносно залежності салуретичної дії досліджуваних настоек від концентрації діючих речовин отримані суперечливі дані: під дією 40 % настойки з листя берези (1:5) натрійуретичний ефект посилюється в 1.6 рази, тоді як під дією 70 % настойки ефект від обох її розведень практично однаковий.

Салуретичний ефект настоек із листя берези, незалежно від способу екстракції і концентрації діючих речовин, практично рівноцінний одержаному під дією Леспенефрилу.

## Висновки

У результаті проведених досліджень 40 % (1:5 і 1:10) та 70 % (1:5 і 1:10) настоек із листя берези бородавчастої встановлена наявність діуретичного та салуретичного ефектів, які за вираженістю дії не поступаються ефекту відомого препарату Леспенефрил, який посідає досить вагоме місце як лікарський засіб при функціональних порушеннях нирок.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. - М.: Наука, 1984. - С. 82-83.
2. Блинов И.П. Лекарственные растения в клинике. - М.: Знание, 1983. - 64 с.
3. Болтарович З.Е. Народна медицина українців. - К.: Наукова думка, 1990. - 230 с.
4. Васильченко Е.А. Фитопрепараты для нефрологии: разработки ГНЦАС и современные аспекты фармакотерапии заболеваний почек // Фармаком. - 1999. - № 3/4. - С. 78.
5. Виноградова Т.А., Гажев Б.Н. и др. Практическая фитотерапия. - М.: "ОЛМА-ПРЕСС"; СПб.: Изд. Дом "Нева", "Валери СПД", 1998. - 640 с.
6. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения (растения-целители). - М.: Высш. шк., 1983. - 400 с.
7. Гарбарев М.О., Западнюк В.Г. Довідник з фітотерапії. - К.: Вища школа, 1981. - 200 с.
8. Гоменюк Г.А., Даниленко В.С. 700 рецептов фитотерапии. - К., 1995. - 84 с.
9. Государственная фармакопея СССР. / МЗ СССР. - 10-е изд. - М.: Медицина, 1968. - 1078 с.
10. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989. - 408 с.
11. Гурвич М.М. Диета для здоровья. Домаш. лечебник. - М.: Лечпромиздат, 1995. - 335 с.
12. Диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. В 3-х т. - Т.2. Болезни органов дыхания, почек, эндокринной системы / Под общ. редакцией Комарова Ф.И. - М.: Медицина, 1991. - 430 с.

13. Дьяконова Н.В. Фитотерапия / Пер. с фр., нем., сербохорватского. - М.: Союзмедформ, 1991. - Вып. 5, 6. - 628 с.
14. Шмерко Е.П., Мазан И.Ф. Практическая фитотерапия. Опыт лечения растениями. - Мн.: "Лечприрода", 1996. - 640 с.
15. Журба О.В. Травник. - М.: Аркадия, 1997. - 544 с.
16. Заупе Ю. Природа - наш доктор. - М.: КРОН-ПРЕСС, 1994. - 304 с.
17. Иванов В.И. Лекарственные средства в народной медицине. - М.: Воениздат, 1992. - 448 с.
18. Кархут В.В. Жива аптека. - К.: Здоровья, 1992. - 306 с.
19. Кархут В.В. Ліки навколо нас. - 3-є вид., випр. і доп. - К.: Здоров'я, 1993. - 232 с.
20. Клінічна фармакологія: Навч. посібник для студентів та інтернів мед. вузів та ін-тів (фак.) удосконалення лікарів: У 2 т. - Т.2 / За ред. Латогуза І.К., Малої Л.Т., Циганенка А.Я. - Х.: Основа, 1995. - 704 с.
21. Ковалев В.Н., Сербин А.Г. 1000 рецептов из лекарственных трав. - К.: НПО "Альфа", 1991. - 136 с.
22. Ковалева Н.Г. Лекарственные растения. - М.: Медицина, 1971. - 350 с.
23. Компендиум 2001/2002 — лекарственные препараты. / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — К.: Морион, 1999. — 908 с.
24. Курочкин Е.И. Лекарственные растения Среднего Поволжья. - 2-е изд., испр. и доп. - Куйбышев: Кн. изд-во, 1989. - 304 с.
25. Лікарські рослини і їх застосування / Харченко М.С., Карамішев А.М., Сила В.І. та ін. - К.: Здоров'я, 1981. - 232 с.
26. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / За ред. академіка АН УССР Гродзінського А.М. - К.: Голов. ред. укр. рад. енциклопедії ім. М.П. Бажана, 1991. - 344 с.
27. Лавренова Г.В., Лавренов В.К., Онипко В.Д. От всех болезней (Лекарственные растения полей и лесов): Справочник - Донецк: М.П. «Отечество», 1994. - 523 с.
28. Лекарственные растения в гастроэнтерологии / Зинченко Т.В., Стахив И.В., Мякушко Т.Я. и др. - К.: Наукова думка, 1989. - 240 с.
29. Лекарственные растения Сибири для лечения сердечно-сосудистых заболеваний / Казаринова Н.В., Ломоносова М.Н., Триль В.М. и др. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. - 240 с.
30. Лікарські препарати України. 1999-2000 / Богатирьова Р.В., Возіанов А.Ф., Спіженко Ю.П. та ін. - Т.1. - А - К.-Х.: Прапор, 1999. - 622 с.
31. Мамчур Ф.І. Фітотерапія в урології. - 3-є вид., перероб. і доп. - К.: Здоров'я, 1991. - 144 с.
32. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2-х т. — Изд. 13-е, новое. — Харьков: Торсинг, 1997. — 592 с.
33. Минеджян Г.З., Минеджян З.Г. Сборник по народной медицине и нетрадиционным способам лечения. Рецептурный справочник. - Ч. 1. - Изд. 2-е, перераб. - М.: Багира, 1996. - 306 с.
34. Мухин Н.А., Тареева И.Е. Диагностика и лечение болезней почек. - М.: Медицина, 1985. - 240 с.
35. Носаль М.А., Носаль И.М. Лекарственные растения в народной медицине. - М.: Внешбиберика, 1991. - 255 с.
36. Основы практической фитотерапии. Учебное пособие / Ковалев В.Н., Зупанец И.А., Кисличенко В.С., Журавель И.А., Шмараева И.Э., Криворучко Е.В., Красникова Т.А. — Х.: Харків, 1999. - 304 с.
37. Палов М. Энциклопедия лекарственных растений. - М.: Мир, 1998. - 467 с.
38. Памуков Д. П., Ахтарджієв Х.З. Аптека живої природи /Пер. з болг. - К.: Урожай, 1991. - 304 с.
39. Пастушенков Л.В., Лесиовская Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии: Учебник. В 2 ч. - С.Пб, 1995.
40. Пашина Г.В. Растения и косметика. - Мн.: Ураджай, 1993. - 252 с.
41. Петков В., Малеев А., Крушков И. и др. Современная фитотерапия. - София: Медицина и физкультура, 1988. - 503 с.
42. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Magnoliaceae-Limoniaceae. - Л.: Наука, 1984. - 460 с.
43. Решетняк В.В., Цигура И.В. Травник. - Х.: Прапор, 1993. - 463 с.
44. Товстуха Є.С. Українська народна медицина. - К.: Газета. "Вечірній Київ": Техніка, 1999. - 456 с.
45. Урология / Под ред. Н.А. Лопаткина. - М.: Медицина, 1977. - 431 с.
46. Фитотерапия в комплексном лечении заболеваний внутренних органов / Крылов А.А., Марченко В.А., Максютин Н.П., Мамчур Ф.И. - К.: Здоров'я, 1991. - 240 с.
47. Французов Б.Л., Французова С. Б., Фрегер И.М. Фитотерапия неспецифических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, трахеи и бронхов. - К.: Здоров'я, 1995. - 120 с.
48. Шулцьев В.П. // Клиническая медицина. - 1981. - № 3. - С. 4-11.
49. Ягодка В.С. Лекарственные растения в дерматологии и косметологии. - К.: Наукова думка, 1991. - 272 с.

#### Резюме

Борисенко Е.И., Кисличенко В.С., Васильченко Е.А.

#### **Береза бородавчатая: фармакотерапевтические свойства, медицинское применение, собственные исследования влияния настоек на функции почек**

В приведенном обзоре литературы освещается применение березы бородавчатой (*B. verrucosa* Ehrh.) сем. березовых (*Betulaceae*) в медицине. Широкий спектр лечебных свойств обуславливает перспективы создания на основе растительного сырья березы бородавчатой новых лекарственных средств для нефрологии. Собственные исследования касаются изучения диуретического и салуретического действия 40 % (1:5 и 1:10) и 70 % (1:5 и 1:10) настоек листьев березы бородавчатой.

#### Summary

Borisenko E.I., Kislichenko V.S., Vasilchenko E.A.

#### ***Betula verrucosa*: pharmacotherapeutic properties, medical use, in-house researches of tinctures influencing on kidneys functions**

In this literature review the different use of Birch (*B. verrucosa* Ehrh.) in medicine is shown. The broad spectrum of medical properties stipulates the outlooks of creation of new pharmaceuticals for a nephrology on the basis of this plant raw material. The in-house researches concern the study of diuretic and saluretic properties of tinctures 40 % (1:5 and 1:10) and 70 % (1:5 and 1:10) of birch leaves.

**Борисенко Олена Іванівна.** Закінчила Українську фармацевтичну академію (1999). Аспірант кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України (2000).

**Кисличенко Вікторія Сергіївна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1980). Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України (1991). Доктор фарм. наук (2000).

**Васильченко Євгенія Олексіївна.** Закінчила Харківський медичний інститут (1960). Працювала у Державному науковому центрі лікарських засобів (1960-1999). Канд. мед. наук (1970).

## Фармакологічні дослідження

УДК: 616.33:615.246.2:549.67

Бондарев Є.В., Рибачук Д.В.  
Національна фармацевтична академія України

### Експериментальне дослідження можливості використання нового ентеросорбенту цеоліту при лікуванні виразкової хвороби шлунка

Проведено експериментальне дослідження дії нового сорбційного препарату цеоліту на стан слизової оболонки шлунка щурів з експериментальним ураженням шлунка, викликаним уведенням суміші етанолу із преднізолоном та ацетилсаліцилової кислоти. Встановлена виражена противиразкова активність препарату у дозі 500 мг/кг. Новий ентеросорбент цеоліт виявив вірогідну більш ефективну дію при експериментальних виразках шлунка, ніж відомий ентеросорбент ентеросгель.

Згідно зі статистичними даними різних країн, на виразкову хворобу хворіють від 5 % до 10 % населення. В Україні у 2000 році поширеність виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки становила 2387.2 випадків на 100.000 дорослих та підлітків. Проти 1999 року (2325.8) рівень поширеності виразкової хвороби в Україні зріс на 2.6 %.

Виразкова хвороба (ВХ) - це хронічне рецидивуюче захворювання, яке характеризується тяжким і тривалим перебігом, частими ускладненнями і залученням до патологічного процесу інших органів травлення [1,3]. Наведені дані про поширеність цієї хвороби та прогноз захворюваності свідчать про динамічний прогресуючий ріст числа випадків зазначеної патології.

Для лікування ВХ використовують лікарські засоби різних фармакологічних груп рослинного, мінерального та синтетичного походження. У ЦНДЛ НФАУ проходить доклінічні випробування новий природний ентеросорбент цеоліт, який призначений для комплексного лікування різних патологій шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Каталітичні, іонообмінні, сорбційні властивості - це далеко не повний перелік позитивних властивостей цеоліту. Важливе значення має і економічний бік питання. Україна має ряд значних родовищ цеолітових порід, які не поступаються синтетичним аналогам, а за вартістю значно дешевші. Виходячи з цього, використання природних цеолітів у практичній медицині України є актуальним і розкриває широкі перспективи створення лікарських препаратів на їх основі [4].

Ураховуючи поширеність захворювань на виразкову хворобу, викликало науковий інтерес вивчити вплив нового препарату на пе-

ребіг цієї патології у гострому і хронічному експерименті.

#### *Матеріали та методи*

В експериментах використовували білих нелінійних щурів вагою 180-250 г. Дослідження противиразкових властивостей цеоліту проводили на моделі ураження слизової оболонки шлунка (СОШ) сумішшю спирту етилового і преднізолону [5].

Протягом 12 год тварин витримували на голоді з вільним доступом до води. Потім щурам перорально, через металевий зонд, вводили суміш преднізолону в дозі 20 мг/кг і 80 % спирту етилового в розрахунку 0.8 мл на 100 г маси. Цеоліт вивчали в дозі 500 мг/кг. Тварин контрольних груп не лікували. Для порівняння використовували відомий ентеросорбент ентеросгель у дозі 2.1 г/кг. Вибір ентеросгелю обумовлений його показаннями для застосування. У цей час ентеросгель (сорбогель) рекомендують використовувати в клініці для комплексного лікування різних патологій ШКТ, у тому числі виразки шлунка та дванадцятипалої кишки [3].

Через 24 год після уведення суміші спирту етилового із преднізолоном тварин усіх груп виводили з експерименту дислокацією шийних хребців, витягали шлунок, промивали фізіологічним розчином і візуально оцінювали стан СОШ. При цьому враховували площу виразок у балах (S) і відсоток тварин із виразками (T), що дозволило розрахувати інтегральний показник противиразкової активності - виразковий індекс (VI). Градацію виразкової поверхні в балах проводили в залежності від площі виразкових дефектів: 1-2 мм<sup>2</sup> - 1 бал; 3-5 мм<sup>2</sup> - 5 балів; 6-10 мм<sup>2</sup> - 10 балів; у випадку загибелі тварин від перфорації шлунка інтенсивність ураження оцінювали в 15 балів.



Виразковий індекс (ВІ) обчислювали за формулою:

$$VI = \frac{S * T}{100}$$

де S - площа виразкових уражень всіх тварин у групі, у балах;

T - число тварин із виразковими ураженнями в групі, у відсотках.

Для моделювання субхронічної виразки шлунка використовували ураження СОШ щурів лікарським препаратом ацетилсаліциловою кислотою [6]. За одну годину до експерименту тваринам експериментальних груп вводили цеоліт у дозі 500 мг/кг і ентеросгель у дозі 2.1 г/кг, відповідно. Ацетилсаліцилову кислоту вводили 5 разів протягом 3 діб перорально в дозі 150 мг/кг. Тварин контрольної групи не лікували. Оцінку стану слизової оболонки шлунка проводили на четверту добу.

*Результати і обговорення*

Результати експерименту, отримані при проведенні виразкозагоючої дії цеоліту, наведені у Табл. 1.

Провідну роль у формуванні етанол-преднізолонового ушкодження шлунка в даному випадку відіграє інгібування біосинтезу простагландинів (ПГ) - ульцеропротекторів СОШ. Внаслідок цього порушується трофіка слизової оболонки шлунка, знижується енергетичне і пластичне забезпечення тканин і підсилюється вплив агресивних факторів шлункового соку. Уведення кортикостероїдів супроводжується порушенням їх співвідношення з адренкортикотропним гормоном (АКТГ), циркуляторною ішемією ворсин СОШ, активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). На тлі порушень, викликаних преднізолоном, збільшуються гастродеструктивні ефекти 80 % спирту етилового, який викликає дегідратацію і коагуляційний некроз СОШ [7].

У контрольних тварин у 100 % випадків спостерігали ураження слизової оболонки

шлунка у вигляді набряків і гіперемії, глибоких і великих геморагічних ерозій і виразок.

Під впливом цеоліту у дозі 500 мг/кг також спостерігали виразки у всіх тварин, але виразковий індекс (ВІ) знижувався в середньому у 2.2 рази. При уведенні препарату порівняння ентеросгелю в дозі 2.1 г/кг також спостерігали виразки шлунка у всіх тварин, але виразковий індекс знижувався в 1.1 рази. Цеоліт виявив 55 % противиразкову активність при даній патології проти препарату порівняння ентеросгелю, який виявив 6% активність. У групі тварин, які одержували цеоліт, спостерігали вірогідне зниження площі виразок у балах відносно групи контрольної патології.

Співставлення частоти виникнення ушкоджень слизової оболонки у відсотках, площ виразок у балах, виразкового індексу (ВІ) і противиразкової активності у групах дослідних тварин дозволило виявити максимальний терапевтичний ефект нового ентеросорбенту цеоліту, що послужило обґрунтуванням вибору дози 50 мг/кг для подальшого вивчення.

Зважаючи на те, що зазначена експериментальна виразка шлунка, викликана етанол-преднізолоном, швидко загоюється (за 24 год), констатували профілактичну проти-виразкову дію цеоліту.

Таким чином, у результаті вивчення противиразкових властивостей цеоліту на моделі етанол-преднізолонової виразки шлунка встановлено, що препарат порівняння ентеросгель поступається за ефективністю цеоліту.

Результати наступного етапу роботи експериментально підтвердили противиразкову дію ентеросорбенту цеоліту на моделі субхронічної виразки шлунка у щурів, яку викликали ацетилсаліциловою кислотою. Відомо, що експериментальна виразка шлунка, викликана ацетилсаліциловою кислотою за тривалістю і характером перебігу розглядається як субхронічне ураження слизової оболонки

Таблиця 1

**Вплив нового ентеросорбенту цеоліту на стан слизової оболонки шлунка у щурів з експериментальним етанол-преднізолоновим ураженням**

Препарат	Площа виразок, бали	Виразковий індекс (ВІ)	Кількість тварин із виразками, %	Противиразкова активність, %
Контрольна патологія	37.75±1.60	37.75	100	—
Цеоліт, 500 мг/кг	17.00±3.37 **	17	100	55
Ентеросгель, 2.1 г/кг	35.50±3.43	35.5	100	6

\*\* - відхилення, вірогідне по відношенню до групи контрольної патології; P ≤ 0.05

Таблиця 2

**Вплив ентеросорбенту цеоліту на стан слизової оболонки шлунка у щурів із гострим експериментальним ураженням шлунка, викликаним ацетилсаліциловою кислотою**

Препарат	Площа виразок, бали	Виразковий індекс (ВІ)	Кількість тварин із виразками, %	Противиразкова активність, %
Контрольна патологія	38.83±5.83	38.83	100	-
Цеоліт, 500 мг/кг	9.33±2.08 **	9.33	100	76
Ентеросгель, 2.1 г/кг	28.50±1.93 ***	28.5	100	26.6

\*\* - відхилення, вірогідне по відношенню до групи контрольної патології;  $P \leq 0.05$

\*\*\* - відхилення, вірогідне по відношенню до цеоліту;  $P \leq 0.05$

шлунка і як модель виразки, яка має клінічний аналог у людей, які приймають нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ).

У більшості тварин контрольної групи слизова оболонка шлунка характеризувалася набряклістю, гіперемією, багатьма ділянками крововиливів, виразками, що кровоточили.

Внаслідок лікування, проведеного ентеросорбентом цеолітом у дозі 500 мг/кг (Табл. 2), відзначений позитивний вплив препарату, який проявився у зменшенні площі виразок у балах та виразкового індексу.

Під впливом цеоліту в дозі 500 мг/кг ВІ знижувався в середньому в 4.2 рази. Для препарату порівняння ентеросгелю у дозі 2.1 г/кг виразковий індекс знижувався в 1.4 рази. Цеоліт виявив 76 % протиразиразкову активність за даної патології проти препарату порівняння ентеросгелю, який виявив 26.6 % активність. У групі тварин, які одержували цеоліт, спостерігали вірогідне зниження площі виразок у балах відносно групи контрольної патології. Під дією препарату порівняння ентеросгелю площа виразок у тварин була вірогідно вищою, ніж під дією цеоліту.

### Висновки

1. Ентеросорбент цеоліт виявив вірогідну більш ефективну дію при експериментальних виразках шлунка, ніж відомий ентеросорбент ентеросгель.

2. Цеоліт виявляє протиразиразкову дію на моделі субхронічного і гострого ураження СОШ, що дозволяє рекомендувати препарат для застосування при виразках шлунка та прийомі НПЗЗ.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Яковенко Е.П. Хронический гастрит. - Амстердам, 1993. - 362 с.
2. Бабак О.Я., Фадеенко Г.В. Фармакотерапия пептических виразок шлунка і дванадцятипалої кишки. - Харків: Основа, 1997. - 238 с.
3. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000. - Харьков: Прапор, 1999. - Т.3. - С. 203-204.
4. Леонін О.Ю., Рыбачук Д.В., Чуешов В.І. Гранули природного цеоліту - заміна активованого вугілля / Сучасні

проблеми фармації: Тези доп. респ. науково-практичної конференції. - Харків, 1994. - С. 55.

5. Алиева А.Д. Влияние преднизолона на развитие экспериментальных язв желудка у крыс / Материалы выездной научной сессии: Азербайджанский государственный институт усовершенствования врачей. - Махачкала, 1973. - С. 19-20.

6. Сучасна фармакотерапія виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки. Методичні рекомендації. - Харків, 1997. - 24 с.

7. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепехин В.Е. Клиническая фармакология и фармакотерапия. - М.: Универсум Паблицинг, 1997. - 24 с.

### Резюме

Бондарев Е.В., Рыбачук Д.В.

### Експериментальное исследование возможности использования нового энтеросорбента цеолита при лечении язвенной болезни желудка

Проведено експериментальне дослідження дії нового сорбційного препарату цеоліту на стан слизової оболонки желудка крыс с експериментальним поражением желудка, вызванным введением смеси этанола с преднизолоном и ацетилсалициловой кислоты. Установлена выраженная противоязвенная активность препарата в дозе 500 мг/кг. Новый энтеросорбент цеолит проявил достоверное более эффективное действие при экспериментальных язвах желудка, чем известный энтеросорбент энтеросгель.

### Summary

Bondarev E.V., Rybachuk D.V.

### Experimental research of a possibility of zeolite, a new enteric sorbent, use when treating the stomach ulcer

An experimental research of zeolite, a new sorptive product, on a state of rat stomach mucosa with experimental stomach damage induced by introduction of ethyl alcohol mixture with prednisolone and acetylsalicylic acid was carried out. The pronounced antiulcer activity of a drug in a dose of 500 mg/kg was established. The new enteric sorbent, zeolite, demonstrated the reliable more effective effect at experimental stomach ulcers, than the known enteric sorbent enterosgel.

**Бондарев Євген Вікторович.** Закінчив Українську фармацевтичну академію та Харківський державний університет ім. Каразіна (1999). Працює у ЦНІЛ НФАУ (з 2000). Аспірант ЦНДЛ НФАУ (2001).

**Рибачук Дмитро Васильович.** Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1973). Доцент кафедри заводської технології ліків НФАУ.

УДК 615.322:615.218:615.372

Кисличенко В.С., Ткаченко Е.Ю., Кузнецова В.Ю.  
Национальная фармацевтическая академия Украины

## Изучение токсических свойств полисахаридного комплекса из листьев смородины черной

Проведено изучение токсических свойств полисахаридного комплекса из листьев смородины черной - субстанции глюкорибина. Исследованиями специфической токсичности глюкорибина установлено, что изученная субстанция является малотоксичной, не имеет кумулятивных свойств, местнораздражающего действия и мутагенного эффекта. Изучение токсических свойств субстанции глюкорибина при длительном введении в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг выявило отсутствие необратимого воздействия на функции жизненно важных органов подопытных животных и наличие возможного незначительного седативного действия препарата

Современное состояние поиска и разработки новых антиаллергических средств третьего поколения требует создания препаратов с быстрым и выраженным десенсибилизирующим эффектом, не оказывающих угнетающего действия на ЦНС. В связи с этим особую актуальность приобрели препараты, полученные из лекарственного растительного сырья [1,2].

В настоящее время в мире существует большое число фармацевтических фирм, занимающихся созданием и производством препаратов противоаллергического действия, номенклатура которых насчитывает более 20 наименований. Номенклатура отечественных противоаллергических препаратов ограничена производством лекарственных форм гистаглобулина, димедрола, дипразина и диазолина. Наряду с высокой активностью, все они имеют ряд побочных эффектов [3].

В настоящее время в ЦНИЛ НФАУ закончено доклиническое изучение нового противоаллергического препарата, представляющего собой полисахаридный комплекс из листьев смородины черной, под условным названием «Глюкорибин». Предыдущие исследования показали, что субстанция глюкорибина обладает выраженной десенсибилизирующей, анальгетической и противовоспалительной активностью, не обладает аллергизирующим действием и является практически нетоксичной [4,5,6].

Целью данной работы явилось более глубокое изучение токсических свойств глюкорибина при однократном и многократном введении, кумулятивных свойств, местнораздражающей активности и возможного мутагенного действия.

### Материалы и методы исследования

Кумулятивное действие изучали на белых крысах-самцах по методу Lim и соавторов [7] при пероральном введении препарата в течение

28 сут. Так как  $LD_{50}$  при этом пути введения не установлены, в качестве исходной дозы брали 1/20 часть максимально вводимой дозы, равной 20 мг/кг, увеличивая вводимую дозу в 1.5 раза каждые 4 сут. В ходе эксперимента отмечали ежедневно вводимую и суммарную дозы (в мг/кг и частях от максимальной вводимой дозы), контролировали динамику массы тела животных перед каждым увеличением вводимой дозы, а также гибель и отсутствие гибели животных.

Мутагенное действие препарата изучали методом учета рецессивных летальных мутаций у дрозофил. Субстанция глюкорибина вводилась в культуральную среду в дозе 40 мг/кг, которая является максимальной дозой, не вызывающей на ней бурного роста микроорганизмов. Эта доза не влияла на жизнеспособность дрозофил [8].

Токсические эффекты субстанции глюкорибина оценивали по влиянию на динамику массы тела, общее состояние и поведение животных, на показатели функционального состояния ЦНС (метод открытого поля), сердечно-сосудистой системы (данные ЭКГ), продолжительности медикаментозного сна, почек (суточный диурез, содержание мочевины и хлоридов в моче, относительная плотность мочи), поджелудочной железы (количество глюкозы в крови) [9] и клинический анализ крови. Указанные показатели у животных регистрировали в динамике: в начале опыта и через 1, 3 и 6 мес после введения полисахаридного комплекса из листьев смородины черной. После окончания опыта животных декапетировали, удаляли и взвешивали внутренние органы, рассчитывали весовые коэффициенты, которые служили интегральными показателями функционального состояния органов животных, проводили патоморфологические исследования органов.

### Результаты исследований и их обсуждение

При изучении кумулятивного действия не была отмечена гибель животных. Отсутствовали также внешние признаки токсичности глюкорибина в течение всего срока наблюдения, хотя суммарная доза препарата составила 124700 мг/кг. Результаты исследования позволяют сделать вывод об отсутствии кумулятивных свойств у субстанции глюкорибина.

Местнораздражающее действие полисахаридного комплекса из листьев смородины черной изучалось путем закапывания раствора субстанции в глаз кроликов (второй глаз служил контролем) [10]. Признаков раздражения слизистой оболочки глаза не отмечали в течение 7 сут наблюдений, что говорит об отсутствии местнораздражающего действия препарата.

В ходе эксперимента по изучению мутагенных свойств субстанции глюкорибина проанализировано 1000 и 1011 подвергшихся действию препарата X-хромосом. Частота полученных мутаций в опыте не отличалась от таковой в контроле, что позволяет говорить об отсутствии мутагенного действия полисахаридного комплекса на хромосомы *D.melanogaster*. Единство генетического аппарата в живой природе позволяет предполагать отсутствие мутагенного воздействия глюкорибина на хромосомы человека.

Токсические свойства глюкорибина при длительном введении изучали на белых кры-

сах с учетом возможных половых отличий, в соответствии с предполагаемыми сроками применения препарата в клинике. Крысам препарат вводили в дозах: 100 мг/кг ( $2E_{D_{50}}$ ) в течение 6 мес.

В течение всего периода хронических исследований животные были активны, охотно принимали пищу, равномерно увеличивали массу тела, что свидетельствует об отсутствии негативного воздействия в результате длительного введения глюкорибина на общие трофические процессы у подопытных животных. Не выявлены были и существенные изменения в работе сердца крыс: ЧСС, величины интервалов и пиков ЭКГ, систолические показатели находились в пределах физиологической нормы.

Исследования состояния ЦНС крыс обнаружило изменения, что свидетельствует об угнетающем действии субстанции глюкорибина. Результаты приведены в Таблице. При получении животными обоих полов глюкорибина в дозе 100 мг/кг также отмечалось понижение интегрального показателя у самцов после третьего месяца эксперимента, а у самок это изменение носит характер тенденции и проявляется после 6 мес испытаний.

Полученные данные свидетельствуют о седативном действии полисахаридного комплекса из листьев смородины черной при длительном введении в дозе, превышающей терапевтическую в 2 раза.

Таблица

**Показатели функционального состояния ЦНС белых крыс под влиянием субстанции глюкорибина в дозе 100 мг/кг**

Показатель	Продолжительность исследований	Самцы				Самки			
		Контроль		Исследование		Контроль		Исследование	
		n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$
Двигательная активность	1 мес	9	16.89±2.55	6	22.83±3.57	9	24.67±3.32	6	25.17±2.60
	3 мес	7	25.03±2.46	7	4.19±2.88*	6	32.00±4.33	6	28.67±6.08
	6 мес	6	20.57±3.29	6	18.33±2.19	6	22.00±3.08	6	9.50±2.78*
Ориентировочно-исследовательская активность	1 мес	9	4.22±0.80	6	3.67±0.61	9	4.00±0.62	6	4.00±1.32
	3 мес	7	3.33±0.49	7	2.43±0.30	6	7.17±1.40	6	3.67±1.05
	6 мес	6	3.29±0.42	6	2.67±1.20	6	4.33±0.61	6	2.33±0.88
Эмоциональная реактивность	1 мес	9	4.00±0.78	6	3.17±1.06	9	1.78±0.64	6	4.33±1.02**
	3 мес	7	0.67±0.33	7	2.29±0.89	6	1.00±0.63	6	1.50±1.02
	6 мес	6	3.29±0.61	6	4.33±2.33	6	1.67±0.49	6	4.57±1.48
Суммарная активность	1 мес	9	25.11±3.02	6	29.67±3.15	9	30.44±3.52	6	33.50±3.36
	3 мес	7	29.83±2.77	7	13.86±3.52*	6	40.17±3.98	6	33.83±7.27
	6 мес	6	26.14±2.70	6	25.33±3.93	6	28.00±3.25	6	16.50±4.36**

Примечания:

- 1) \* - разница достоверна по отношению к контролю  $p < 0.05$ ;
- 2) \*\* - разница достоверна по отношению к контролю  $0.05 < p < 0.1$

При исследовании субстанции глюкокортибина на функциональное состояние почек в ходе эксперимента не было выявлено изменений показателей, которые характеризуют концентрационную, реабсорбционную и азотовыводящую функции почек.

Функциональное состояние поджелудочной железы оценивали по уровню глюкозы в крови. Содержание глюкозы по сравнению с начальными значениями и соответствующим контролем не выходило за пределы физиологической нормы, что говорит об отсутствии влияния изучаемой субстанции в исследуемой дозе на состояние поджелудочной железы животных.

Результаты анализа крови крыс показали, что уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов, а также процентное содержание различных типов лейкоцитов не выходит за пределы физиологических норм, что подтверждает отсутствие влияния глюкокортибина на гемопоэз у подопытных животных.

Таким образом, в ходе эксперимента установлено отсутствие необратимых изменений в исследуемых органах и системах подопытных животных при длительном введении субстанции глюкокортибина в исследуемой дозе.

### Выводы

1. Исследование специфической токсичности субстанции глюкокортибина позволило установить, что изучаемый полисахаридный комплекс из листьев смородины черной малотоксичен, не проявляет кумулятивных свойств, местнораздражающего действия и мутагенного эффекта.

2. Изучение токсических свойств субстанции глюкокортибина при длительном введении в изучаемых дозах показало отсутствие необратимого влияния на функции жизненно важных органов подопытных животных и наличие незначительного седативного эффекта препарата.

3. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать субстанцию глюкокортибина для дальнейшего изучения и создания на ее основе нового противоаллергического препарата растительного происхождения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Симолян А.В., Власенко С.П., Димогло А.С. Электронотопологическое исследование связи структуры и антиаллергической активности производных халкона, кумарина и коричной кислоты // ХПС. - 1996. - № 5. - С. 597-602.  
2. Кисличенко В.С., Антипенская Л.В., Игумнова Н.И. Возможности применения препаратов лекарственных

растений для коррекции иммуноглобулинов при различных заболеваниях // Тез. респ. науч.-практ. конф. к 70-летию ХФИ. - Харьков, 1991. - С. 221-222.

3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. - М.: Медицина, 1994. - Ч. 1. - С. 351-365.  
4. Сидоров К.А. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. В кн.: Токсикология новых промышленных химических веществ. - М., 1973. - Вып. 13. - С. 47-57.  
5. Новиков Д.К. Клиническая аллергология: Справ. пособие. - Мн.: Высшейш. шк., 1991. - 511 с.  
6. Кольцова Н.И. Социально-гигиенические и экономические аспекты аллергических заболеваний: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - М., 1981. - 19 с.  
7. Lim R.K.S., Rink K.C. et al. A method for the evolution of and cumulating and by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Int. Pharmacology. - 1961. - V. 130, № 3-4. - P.336-353.  
8. Бурков В.С. Исследование мутагенной активности широко распространенных лекарственных препаратов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 1971. - 25 с.  
9. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической биохимии. - Мн.: Беларусь, 1982. - 366 с.  
10. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны / Сост. Саноцкий М.В., Иванов Н.Г. - М.: МЗ СССР, 1980. - 37 с.

### Резюме

Кисличенко В.С., Ткаченко О.Ю., Кузнецова В.Ю.

### Вивчення токсичних властивостей полісахаридного комплексу з листя смородини чорної

Проведене вивчення токсичних властивостей полісахаридного комплексу з листя смородини чорної - субстанції глюкокортибіну. Дослідженнями специфічної токсичності глюкокортибіну встановлено, що вивчена субстанція є малотоксичною, не має кумулятивних властивостей, місцево подразнюючої дії та мутагенного ефекту. Вивчення токсичних властивостей субстанції глюкокортибіну при тривалому введенні в дозах 50 мг/кг і 100 мг/кг виявило відсутність необоротного впливу на функції життєво важливих органів піддослідних тварин і наявність можливої незначної седативної дії препарату.

### Summary

Kislichenko V.S., Tkachenko H.Y., Kuznetzova V.Y.

### Study of toxic properties of polysaccharide complex from leaves of Black Currant

The learning of toxic properties of polysaccharide complex from Black Currant leaves - Glucoribin substance - was carried out. The investigation of specific toxicity of glucoribin showed that the substance being investigated is low toxic and possesses no cumulative properties, local irritating action any mutagenous effect. The study of glucoribin substance toxic properties by long term introduction of one in the doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg has revealed an absence of irreversible influence on the function of experimental animal essential organs and a presence of possible insignificant sedative effect of the preparation.

**Кисличенко Виктория Сергеевна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1980). Канд. фарм. наук (1985). Доктор фарм. наук (1999). Профессор кафедры фармакогнозии НФАУ (2001).

**Ткаченко Елена Юрьевна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1991). Мл. науч. сотрудник ЦНИЛ. Соискатель (с 1999).

**Кузнецова Виктория Юрьевна.** Окончила Национальную фармацевтическую академию Украины (2002).

УДК 615.45.779.63/66-591

Топчиева Ш.А.

Институт зоологии Национальной академии наук Азербайджана

### Флуоресцентные зонды в исследовании змеиного яда

В эксперименте на 180 белых беспородных мышах 2-3-х месячного возраста с применением флуоресцентной метки изучена фармакокинетика и распределение яда закавказской гюрзы - *Vipera lebetina obtusa*. Определение змеиного яда проведено на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Japan), оно основано на измерении параметров флуоресценции при  $\lambda_{\text{ex}}$  480 нм (возбуждение) и  $\lambda_{\text{em}}$  540 нм (испускание). Найдены основные фармакокинетические параметры, характеризующие кинетику всасывания и элиминации змеиного яда. Приведенные исследования показали возможность изучения фармакокинетики змеиного яда по метке флуоресцеина, что имеет исключительное значение для диагностики и оптимизации фармакотерапии больных, ужаленных ядовитыми змеями.

Для правильного проведения фармакотерапии при интоксикации змеиными ядами актуальным является изучение проникновения животных ядов в органы и ткани. Важность проблемы определяется тем, что местом действия ядов является не только кровь, но и другие клетки и ткани организма [1, 2].

Изучение распределения яда гюрзы в живом организме представляется необходимым не только для определения тяжести интоксикации, прогноза заболевания, но и для выработки мер борьбы с наступившими сдвигами в организме, а также для предупреждения возможных осложнений. Изучение данной проблемы актуально с точки зрения выбора наиболее рациональных мер борьбы с проявлениями интоксикации змеиными ядами, при неправильном лечении нередко заканчивающимися летальным исходом. Это также имеет большое значение в свете выявления возможности использования небольших доз яда, а также входящих в его состав отдельных фракций и ферментов в качестве лекарственных средств.

С применением флуоресцентных зондов появилась уникальная возможность исследовать вопросы, которые были недоступны экспериментальному изучению другими способами [3, 4].

Для белков одним из наиболее распространенных флуоресцирующих зондов является флуоресцеин.

Спектры флуоресценции в большей степени, чем спектры поглощения, зависят от молекулярного окружения [8-10]. Путем измерения флуоресценции можно получить сведения о конформации, местах связывания, взаимодействиях с растворителем, степени

гибкости, межмолекулярных расстояниях и коэффициентах вращательной диффузии макромолекул. Флуоресценцию также можно использовать для локализации в живых клетках тех веществ, которые невозможно обнаружить другими методами [1, 2, 12]. Для надежной регистрации параметров флуоресценции требуются меньшие количества вещества. В связи с этим использование флуоресцентной спектроскопии дает определенные преимущества по сравнению с измерением поглощения [7, 8, 11].

В литературе приводятся единичные работы о возможности применения флуоресцентных зондов в фармакологии при изучении распределения лекарственных препаратов в тканях и клетках живого организма. Данные по изучению фармакокинетики яда закавказской гюрзы с применением флуоресцентного зонда в других источниках, кроме наших работ, отсутствуют [1-3, 11, 12].

Целью настоящей работы явилось изучение распределения и биотрансформации зоотоксина. Эксперименты проводили на 180 белых беспородных мышах-самцах и мышах-самках трехмесячного возраста массой 20-25 г. Яд гюрзы в физиологическом растворе с флуоресцеином, вводили внутривенно (в/в) в дозе 0.2 мг/г. Каждая опытная группа состояла из 5 животных. Для анализа забиралась цельная кровь через 0.5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин после введения зоотоксина подопытным животным.

#### Объекты и методы исследования

Распределение яда гюрзы в организме экспериментальных животных с применением

флуоресцентного зонда - флуоресцеина определяли на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Japan) [1, 11, 12].

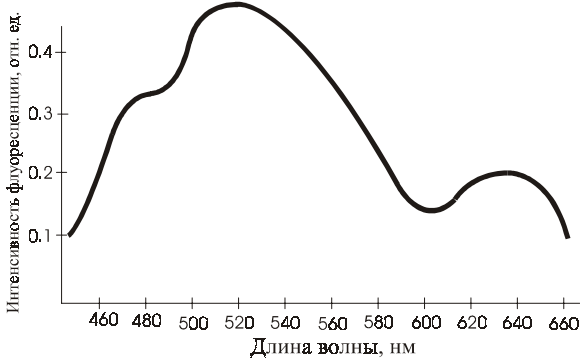
Интенсивность флуоресценции измеряли в кюветах с толщиной слоя 10 мм и объемом 3 мл при  $\lambda_{ex}$  480 нм (возбуждение) и  $\lambda_{em}$  540 нм (испускание). Полуширина полос возбуждения и испускания составляла 10 нм.

Для спектрофлуориметрического определения яда гюрзы, связанного с флуоресцеином, в 1 мл физиологического раствора, содержащего флуоресцентный зонд, вносили яд гюрзы (0.009 мкг, 0.09 мкг, 0.19 мкг, 0.38 мкг, 0.75 мкг, 1.5 мкг, 3.0 мкг, 6.0 мкг, 120 мкг), тщательно перемешивали в течение 5-10 мин и определяли среднюю интенсивность флуоресценции.

Спектр флуоресценции флуоресцеина, связанного с ядом гюрзы, представлен на Рис. 1. Из рисунка можно сделать вывод, что форма спектра испускания флуоресценции зонда в смеси с ядом изменяется. Появляется плечо при длине волны 480 нм, в 2 раза расширяется полуширина основного максимума при длине волны 520 нм, а также появляется дополнительный максимум при длине волны 630 нм.

Рисунок 1

**Спектр испускания флуоресценции флуоресцеина, связанного с ядом гюрзы**



Из спектра возбуждения флуоресценции флуоресцеина, связанного с ядом, представленного на Рис. 2, видно, что максимум флуоресценции отмечается при длине волны 360 нм. Из сравнения спектра испускания флуоресценции зонда и спектра испускания флуоресценции смеси зонда с ядом можно предположить, что образуется комплекс яда с флуоресцеином. Поэтому форма и максимумы спектра испускания изменяются. Этот вывод подтверждается ещё и тем, что в спектрах испускания флуоресценции зонда с ядом и без него при длине волны 520 нм (ос-

новной максимум) происходит перераспределение энергии между ядом и флуоресцеином.

Рисунок 2

**Спектр возбуждения флуоресценции флуоресцеина, связанного с ядом гюрзы**

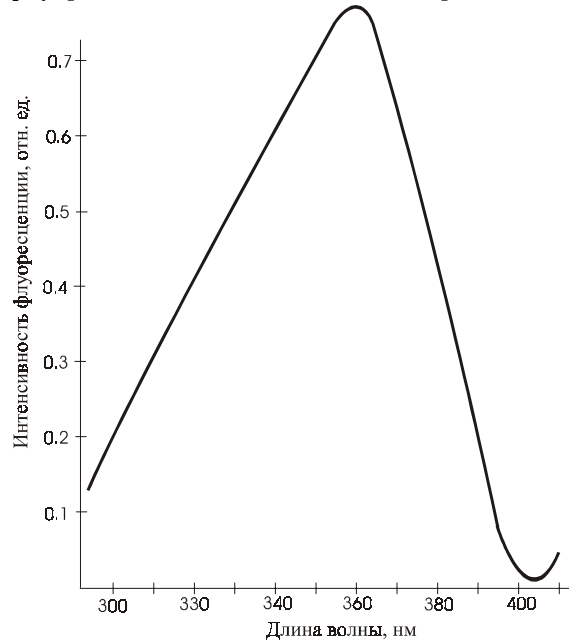


Таблица 1

**Интенсивность флуоресценции флуоресцеина в физиологическом растворе при различных концентрациях яда гюрзы**

Концентрация яда, мкг/мл	Интенсивность флуоресценции зонда ( $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ , отн. ед.)
0.009	0.75±0.12
0.09	1.02±0.01
0.19	1.97±0.37
0.38	4.56±0.31
0.75	9.00±0.42
1.50	16.18±0.53
3.0	34.45±1.39
6.0	71.22±0.34
12.0	83.80±0.15

Данные о средней интенсивности флуоресценции флуоресцеина в физиологическом растворе при различных концентрациях яда гюрзы приведены в Табл. 1. Прямо пропорциональная зависимость между интенсивностью флуоресценции зонда, связанного с ядом гюрзы, и количеством зоотоксина отмечается в пределах от 0.19 мкг/мл до 6 мкг/мл.

Флуоресцентный зонд связывается с ядом гюрзы, квантовый выход и спектры флуоресценции изменяются при связывании с белком. Методика апробирована на крови мы-

шей. В 0.1 мл крови вносили яд гюрзы в количестве 0.009 мкг, 0.09 мкг, 0.19 мкг, 0.38 мкг, 0.75 мкг, 1.5 мкг, 3.00 мкг, 6.00 мкг, 12.00 мкг, связанный с флуоресцеином в физиологическом растворе. Тщательно перемешивали в течение 15 мин и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4°С. Измерение флуоресценции проводили при длине волны  $\lambda$  480/540 нм (Табл. 2).

Таблица 2

**Интенсивность флуоресценции зонда при различных концентрациях яда в крови мышей**

Концентрация яда гюрзы, мкг/мл	Интенсивность флуоресценции зонда ( $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ , отн. ед.)
0.009	0.25±0.003
0.09	0.45±0.01
0.19	1.79±0.05
0.38	3.41±0.25
0.75	8.10±0.31
1.50	17.18±0.53
3.00	34.24±0.39
6.00	68.94±1.07
12.00	79.21±2.29

Таким образом, флуоресценция системы зонд-растворитель-яд отражает весьма сложную картину взаимодействий. Эта чувствительность зонда к реальному окружению и является предпосылкой его применения при изучении распределения и фармакокинетики яда закавказской гюрзы.

#### Результаты и их обсуждение

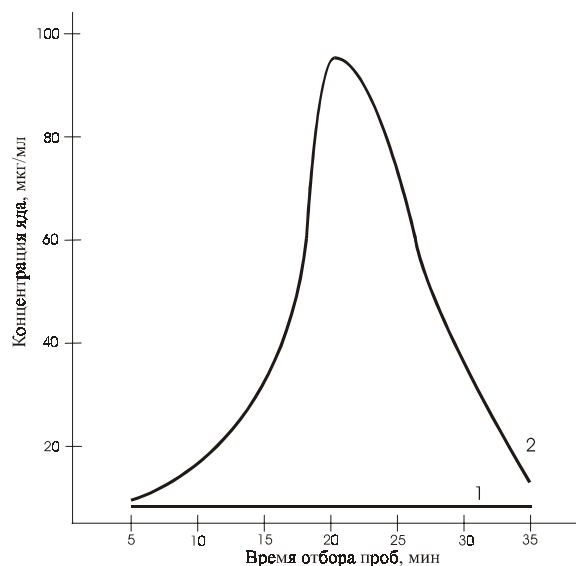
Изучение распределения и фармакокинетики яда в организме животных показали, что через 10 мин после в/б введения наблюдалось повышение концентрации зоотоксина и продуктов его биотрансформации (в среднем 10.7 мкг/мл), далее, к 15 мин, концентрация его увеличивалась и составляла 31.3 мкг/мл и к 20 мин с начала введения резко повышалась, достигая своей максимальной величины (в среднем 91.1 мкг/мл). Затем содержание яда постепенно снижалось и к 35 мин после введения зоотоксина составляло лишь 16 % от максимального уровня (в среднем 14.3 мкг/мл) (Рис. 3).

Количественное определение зоотоксина в крови экспериментальных животных позволило построить кривую изменения концентрации, которая в полулогарифмической шкале имела моноэкспоненциальную зависимость. Для описания фармакокинетики яда использовали однокомpartmentальную мо-

дель со всасыванием. Одночастевая модель адекватно оценивает данные, полученные после в/б введения зоотоксина.

Рисунок 3

**Динамика концентрации яда гюрзы в крови мышей после в/б введения зоотоксина (доза яда 0.2 мг/г)**



1-контроль, 2-опыт

Таблица 3

**Динамика концентрации яда гюрзы в крови мышей после в/б введения зоотоксина (доза яда 0.2 мг/г)**

Время отбора проб крови, мин	Найдено зоотоксина в крови, мкг/мл	
	контрольная группа	опытная группа
5	4.80±0.07	7.73±0.07
10	4.92±0.04	10.72±0.07
15	4.94±0.06	31.28±0.25
20	5.34±0.08	91.10±0.65
25	4.00±0.05	60.36±0.65
30	5.10±0.05	35.50±0.35
35	5.24±0.08	14.34±0.12

На основе экспериментальных данных определены основные фармакокинетические параметры, характеризующие кинетику змеиного яда:  $V_d$  - кажущийся объем распределения,  $t_{1/2}$  - период полуэлиминации,  $t_{1/2\alpha}$  - период полувсасывания,  $K_{01}$  - константа скорости всасывания,  $K_{el}$  - константа скорости элиминации,  $Cl_T$  - общий клиренс,  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  - площадь под фармакокинетической кривой. Фармакокинетические параметры, найденные по концентрациям зоотоксина, представлены в Табл. 4.



Фармакокинетика яда гюрзы исследована путем аппроксимации средних концентраций в крови мышей. Методами математического моделирования найдены параметры, характеризующие всасывание, распределение и элиминацию змеиного яда при в/б введении.

Таблица 4

**Фармакокинетические параметры змеиного яда в крови мышей (доза яда 0.2 мг/г)**

Параметры	Статистические показатели (M ± m)
V <sub>d</sub> , мл	4.45±0.27
K <sub>el</sub> , мин <sup>-1</sup>	0.79±0.01
K <sub>01</sub> , мин <sup>-1</sup>	2.24±0.02
t <sub>1/2</sub> , мин	0.88±0.03
Cl <sub>T</sub> , мл/мин	3.49±0.19
t <sub>1/2</sub> , α, мин	0.31±0.003
AUC <sub>0→∞</sub> , мкг.мин.мл <sup>-1</sup>	942.82±64.85

Таблица 5

**Динамика распределения яда гюрзы в органах мышей после в/б введения зоотоксина (доза яда 0.2 мг/г)**

Время отбора проб, мин.	Найдено зоотоксина в тканях, мкг/г		
	сердце	легкие	селезенка
0 (контроль)	8.56 ± 0.11	4.60 ± 0.03	6.69 ± 0.04
5	16.72 ± 0.09	7.61 ± 0.06	18.01 ± 0.05
10	25.51 ± 0.35	16.72 ± 0.17	28.23 ± 0.25
15	23.88 ± 0.34	13.82 ± 0.11	34.03 ± 0.50
20	21.66 ± 0.19	8.18 ± 0.13	33.03 ± 0.46
25	21.13 ± 0.21	6.94 ± 0.05	26.38 ± 0.23
30	17.78 ± 0.10	5.62 ± 0.06	24.86 ± 0.05
35	12.35 ± 0.04	4.56 ± 0.06	3.60 ± 0.03

Экспериментальные наблюдения показали неадекватность кинетики распределения зоотоксина в организме животных.

Динамика распределения яда в сердечной мышце отмечается максимальным содержанием зоотоксина к 10 мин после введения яда (в среднем 25.5 мкг/г). Концентрация постепенно снижается и к 35 мин достигает 12.3 мкг/г (48 % от максимальной концентрации).

Максимальное содержание яда в легких отмечается через 5 мин после введения (в среднем 16.3 мкг/г), через 15 мин снижается и достигает 85 %, через 20 мин уровень зоотоксина достигает 8.2 мкг/г с последующим постепенным снижением через 35 мин до 28 % (в среднем 4.6 мкг/г) от первоначальной максимальной концентрации.

Кривая распределения яда гюрзы и продуктов его биотрансформации в тканях селезенки отмечается максимальным значением концентрации 34.0 мкг/г через 15 мин после введения яда. Значительное снижение содержания зоотоксина в селезенке (до 11 %) отмечается через 35 мин после введения яда и составляет в среднем 3.6 мкг/г (Табл. 5).

Таблица 6

**Динамика распределения яда гюрзы в органах и тканях мышей после в/б введения зоотоксина (доза яда 0.2 мг/г)**

Время отбора проб, мин.	Найдено зоотоксина, мкг/г		
	мышцы	почки	печень
0 (контроль)	9.49 ± 0.04	7.27 ± 0.11	3.47 ± 0.02
5	17.20 ± 0.13	18.88 ± 0.20	3.85 ± 0.04
10	41.58 ± 0.0	44.07 ± 0.71	6.52 ± 0.10
15	29.15 ± 0.46	80.88 ± 0.83	6.48 ± 0.06
20	28.63 ± 0.41	49.60 ± 0.70	5.78 ± 0.06
25	26.42 ± 0.37	34.74 ± 0.43	4.62 ± 0.06
30	22.26 ± 0.10	21.86 ± 0.17	4.32 ± 0.04
35	19.68 ± 0.13	8.26 ± 0.05	3.65 ± 0.04

Характер динамики распределения яда гюрзы в мышцах выражается максимальной величиной через 10 мин после введения зоотоксина и составляет 41.6 мкг/г. Максимальное снижение концентрации яда и продуктов его биотрансформации наблюдается через 35 мин после введения и составляет в среднем 19.7 мкг/г (47 % от максимальной величины). Максимальная концентрация яда в почечной ткани наблюдается через 15 мин и составляет 80.9 мкг/г, далее отмечается постепенное снижение концентрации зоотоксина и его метаболитов с минимально определяемым количеством 8.26 мкг/г (10 % от максимальной концентрации).

Характер распределения зоотоксина в печеночной ткани отличается низким содержанием яда с максимальным средним значением 6.5 мкг/г через 10 мин после начала введения яда. Минимально определяемая концентрация зоотоксина в печени мышей отмечается через 35 мин после внутрибрюшинного введения яда, достигая 3.6 мкг/г (Табл. 6).

Проведенные исследования показывают, что яд гюрзы и продукты его метаболизма в незначительных количествах обнаруживаются в тканях печени, легких, сердца, селезенки, мышц и почек; максимальное содержание зоотоксина наблюдается в тканях почек, минимальное - в тканях печени.

Нам представилась возможность испытать на практике разработанный нами метод вне-

сенной флуоресценции для определения содержания яда в крови людей при интоксикации различной степени, развивающейся после укуса ядовитых змей.

Исследования проведены в крови больных, находившихся на лечении после укусов змей в Республиканском токсикологическом центре г. Баку (1997-1999 гг).

Возраст больных колебался в пределах 12-42 лет, из них 11 мужчин, 4 женщины. Определение змеиного яда в крови больных проводили при сочетании методов экстракции в системе жидкость-жидкость.

За время пребывания в клинике у всех больных спустя 10 час после укуса в нижнюю часть голени бралась кровь из пальца в количестве 0.1 мл (один раз для спектрофлуориметрического количественного определения содержания змеиного яда).

Таблица 7

**Уровень концентрации змеиного яда в крови больных с различной степенью интоксикации**

Степень интоксикации	Найдена концентрация яда (мкг/мл; n=5)
Легкая	0.49 ± 0.12
Средняя	4.93 ± 0.25
Тяжелая	17.10 ± 1.91

Умеренный эффект (Табл. 7, Рис. 4) наблюдается при содержании токсинов в крови больных в пределах 0.12-0.85 мкг/мл (в среднем 0.49 мкг/мл), а серьезные токсические проявления змеиного яда - при содержании 14.50-20.30 мкг/мл (в среднем 17.10 мкг/мл).

На основании данных о концентрации змеиного яда в крови больных можно установить максимальный уровень токсинов и максимально допустимую безопасную концентрацию, то есть установить вероятность возникновения выраженных токсических явлений. Если концентрация яда будет выше максимально допустимой, тогда исход лечения может оказаться под угрозой. Средние величины минимально и максимально допустимых концентраций могут индивидуально колебаться, однако для многих случаев различия оказываются значительно меньше, чем индивидуальные колебания (Рис. 4).

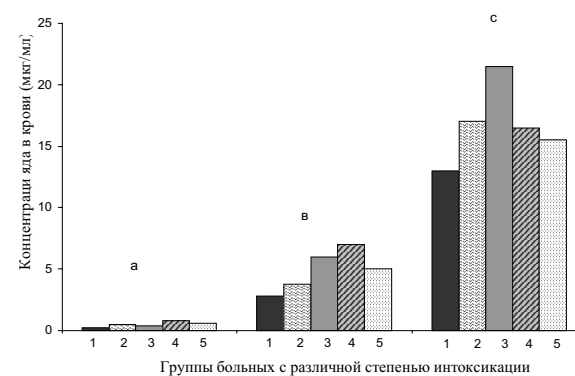
Полученные результаты носят предварительный характер и показывают принципиальную возможность использования метода.

Примененный нами метод внесенной флуоресценции, с нашей точки зрения, может стать одним из действенных способов

контроля за содержанием зоотоксинов в крови больных при отравлениях змеиными ядами. Особенно следует подчеркнуть, что способ флуоресцентных зондов принадлежит к числу методов экспресс-анализа, для проведения которого необходимо минимальное количество времени - около 20 мин (с момента взятия пробы) и малое количество крови - 0.2-0.02 мл.

Рисунок 4

**Уровень содержания яда гюрзы в крови больных с различной степенью интоксикации**



a - лёгкая степень, b - средняя степень, c - крайне тяжёлая степень

Таким образом, с помощью флуоресцентного зонда можно следить за изменениями в органах, тканях и крови независимо от времени введения зонда после интоксикации ядом. Применение флуоресцентного зонда дает возможность получить принципиально новые данные о распределении яда гюрзы, которые не удавалось исследовать другими методами.

Метод флуоресцентных зондов открыл новую возможность исследования фармакокинетики зоотоксинов и определения их концентраций с целью оказания эффективной и оптимальной фармакотерапии при отравлениях животными ядами.

### Выводы

1. Впервые разработана методика спектрофлуориметрического определения яда гюрзы в различных биологических средах, основанная на измерении параметров флуоресценции при  $\lambda$  480/540 нм, обладающая высокой чувствительностью и воспроизводимостью.

2. Изучена фармакокинетика и распределение зоотоксина в различных органах мышей. Методами математического моделирования найдены основные фармакокинетические параметры, характеризующие всасыва-

ние, распределение и элиминацию змеиного яда.

3. Методика применена для определения содержания зоотоксина в крови людей, ужаленных ядовитыми змеями. При этом установлено, что легкая степень интоксикации характеризуется содержанием яда в крови в пределах 0.12-0.85 мкг/мл, средняя - 3.5-16.5 мкг/мл, тяжелая - 14.50-20.3 мкг/мл.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Топчиева Ш.А. Оптимизация фармакотерапии при интоксикации змеиным ядом методом флуоресцентных зондов // Материалы конф., посв. 60-летию высшего фармацевтического образования в Азербайджане. - Баку. - 1998. - С. 209-211.
2. Топчиева Ш.А. Метод флуоресцентных зондов в исследовании фармакокинетики змеиного яда // Достижения мед. науки и практического здравоохранения Азербайджана. Материалы респ. науч. конф. - Баку. - 1998. - Т. 2 - С. 516-520.
3. Топчиева Ш.А. Изучение распределения яда гюрзы в организме после интоксикации // Там же. - С. 505-510.
4. Арсеньев А.С., Сурия А.М., Уткин Ю.Н. Сравнительное исследование коротких нейротоксинов змеиного яда методами протонного магнитного резонанса и флуоресценции // Биоорганическая химия. - 1978. - Вып. 4. - № 2. - С. 197-207.
5. Баренбойм Г.М., Дмитровская Т.В., Иванов Л.С., Морозова Г.И. Контактная флуоресцентная микроскопия в фармакологии и биологических испытаниях химических соединений // Хим. фарм. журнал. - 1982. - Т.16, № 9. - С. 1039-1043.
6. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М., 1980. - 320 с.
7. Зайдель А.Н. Атомно-флуоресцентный анализ. - М.: Наука, 1980. - 192 с.
8. Любимцева Г.Е., Абибова Э., Юкельсон Л.Я. Исследование яда степной гадюки *Vipera ursim renardi*. IV. О гемолитическом действии фосфолипаз  $A_2$  // Химия природных соединений. - 1980. - № 5. - С. 684-686.
9. Маликов М. О химическом составе ядов змей // Экология и биология животных Узбекистана. - Ташкент, 1969. - С. 3-5.
10. Топчиева Ш.А. К метаболизму яда закавказской гюрзы и лекарственных препаратов из группы сложных эфиров азотной кислоты в организме // Известия БГУ. - Баку. - 2000. - № 3. - С. 71-76.
11. Топчиева Ш.А. Определение количества змеиного яда // Достижения мед. науки и практического здравоохранения Азербайджана. Материалы респ. науч. конф. - Баку. - 1998. - Т. 2 - С. 510-516.
12. Топчиева Ш.А. Определение змеиного яда в организме методом флуоресцентных зондов при интоксикации. Методические рекомендации. - Баку, 1997. - 11 с.

#### Резюме

Топчієва Ш.А.

#### Флуоресцентні зонди у дослідженні зміїної отрути

В експерименті на 180 білих безпородних мишах 2-3-х місячного віку із використанням флуоресцентної мітки вивчена фармакокінетика і розподіл отрути закавказької гюрзи - *Vipera lebetina obtusa*. Визначення зміїної отрути проведено на спектрофлуориметрі Hitachi-850 (Japan), воно засноване на вимірюванні параметрів флуоресценції за  $\lambda_{\text{ex}}$  480 нм (збудження) та  $\lambda_{\text{em}}$  540 нм (емісія). Знайдені основні фармакокінетичні параметри, що характеризують кінетику всмоктування та елімінації зміїної отрути. Приведені дослідження показали можливість вивчення фармакокінетики зміїної отрути за міткою флуоресцеїну, що має виключне значення для діагностики та оптимізації фармакотерапії хворих, що ужалені отруйними зміями.

#### Summary

Topchiyeva Sh.A.

#### Fluorescent probes in snake venom investigation

In experiment with 180 white breed-less mice 2 to 3 months old using the fluorescent marker the pharmacokinetics and distribution of *Vipera lebetina obtusa* venom were studied. The snake venom determination was carried out using the spectrofluorimeter Hitachi-850 (Japan); it is based on the measurement of fluorescence parameters at  $\lambda_{\text{ex}}$  480 nm (excitation) and  $\lambda_{\text{em}}$  540 nm (emission). The main pharmacokinetic parameters characterizing the absorption of kinetics and elimination of the snake venom were found. The investigations performed showed the possibility of the snake venom pharmacokinetics study using the fluorescein marker, that is of exclusive significance for the diagnostics and optimization of pharmacotherapy in patients bitten by venomous snake.

УДК: 546.289: 577.115-121.7+577.164.15:616-001.834

Немятых О.Д.

Луганский государственный медицинский университет

## **Влияние координационного соединения германия с никотиновой кислотой на окислительно-антиоксидантное равновесие в мозге крыс с гипоксией замкнутого пространства**

Проведены комплексные исследования по изучению прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в коре головного мозга крыс на фоне профилактического введения координационного соединения германия с никотиновой кислотой в условиях гипоксии замкнутого пространства. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о выраженной антиоксидантной активности изучаемого соединения.

Ключевым звеном патогенеза гипоксического синдрома является нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия, реализуемое активацией свободно-радикальных реакций с последующим ингибированием активности ферментов антирадикальной защиты клетки [6]. Одним из перспективных направлений поиска и разработки высокоэффективных средств фармакотерапии гипоксических состояний замкнутого пространства следует считать фармакологическую регуляцию окислительно-антиоксидантного гомеостаза [4].

Ранее проведенными нами скрининговыми исследованиями на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией выявлена выраженная антигипоксантная активность координационного соединения германия с никотиновой кислотой (МИГУ-1), синтезированного на кафедре общей химии и полимеров Одесского государственного университета им. И.И. Мечникова, а также установлен оптимальный режим дозирования этого соединения, что явилось основанием для дальнейшего углубленного изучения фармакологических свойств МИГУ-1 в плане его влияния на состояние процессов липидперекисления и основных компонентов антиоксидантной системы защиты в мозге животных с гипоксией замкнутого пространства, что и составило цель настоящей работы.

### *Материалы и методы исследования*

Опыты выполнены на половозрелых крысах линии «Вистар» массой 160-180 г. Экспериментальной моделью служил патологический процесс, развивающийся у животных при помещении их в герметическую емкость объемом 1 дм<sup>3</sup>. Исследования проведены на трех группах животных. Первую группу составляли интактные крысы, животные второй группы (контроль) подвергались воздействию гипоксии замкнутого пространства в

течение 45 мин, животным третьей группы (опыт) за 77 мин до помещения в гермообъем вводили МИГУ-1 внутривентриально однократно в дозе 120 мг/кг в виде 1 % водного раствора.

Состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия оценивали в гомогенате коры головного мозга животных, как наиболее уязвимой структуре центральной нервной системы при гипоксических состояниях [1], в динамике через 3 ч, 6 ч и 24 ч после окончания моделирования патологического процесса.

Интенсивность течения перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию в исследуемых биосубстратах первичных (диеновые конъюгаты - ДК) [8] и конечных продуктов этого процесса, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактанты) [9].

О состоянии антиоксидантной системы организма (АОС) судили по активности основных компонентов ферментативного звена - супероксиддисмутазы (СОД) [3] и каталазы [2], а также по содержанию глутатиона [11] и сульфгидрильных групп [10].

Перекисную резистентность эритроцитов определяли по методу [5].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента по программе «Statgraphics».

### *Результаты и их обсуждение*

Полученные в работе результаты представлены в таблице. Как показали проведенные исследования, при развитии гипоксии замкнутого пространства наблюдается резкая активация процессов ПОЛ в коре головного мозга с соответствующим увеличением образования и накопления продуктов всех этапов деградации фосфолипидов биомембран, что проявляется в достоверном увеличе-

Таблица

**Влияние МИГУ-1 на динамику изменения содержания продуктов ПОЛ и основных компонентов антиоксидантной системы в коре головного мозга крыс с гипоксией замкнутого пространства (n=6)**

Группа животных	Стат. показатель	Продолжительность исследования (ч)		
		3	6	24
Диеновые конъюгаты (ммоль/г)				
Интактные	M ±m	0.560 ±0.05		
Контроль	M ±m P <sub>1</sub>	0.970 ± 0.10 < 0.05	0.800 ± 0.01 < 0.01	0.840 ± 0.10 < 0.05
Опыт	M ±m P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	0.310 ± 0.04 < 0.01 < 0.001	0.626 ± 0.10 > 0.05 > 0.05	0.356 ± 0.07 < 0.05 < 0.01
ТБК-реактанты (нмоль/г)				
Интактные	M ±m	54.50 ± 4.30		
Контроль	M ±m P <sub>1</sub>	72.70 ± 3.20 < 0.05	130.00 ± 5.90 < 0.001	87.30 ± 8.50 < 0.05
Опыт	M ±m P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	64.90 ± 5.90 > 0.05 > 0.05	75.10 ± 2.30 < 0.01 < 0.001	58.60 ± 2.90 > 0.05 < 0.05
Каталаза (кат/л)				
Интактные	M ±m	179.82 ± 7.49		
Контроль	M ±m P <sub>1</sub>	78.60 ± 12.49 < 0.001	137.19 ± 21.12 > 0.05	167.83 ± 33.52 > 0.05
Опыт	M ±m P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	90.60 ± 7.47 < 0.001 > 0.05	159.84 ± 38.83 > 0.05 > 0.05	186.48 ± 10.07 > 0.05 > 0.05
СОД (усл.ед)				
Интактные	M ±m	57.63 ± 2.26		
Контроль	M ±m P <sub>1</sub>	21.04 ± 1.26 < 0.001	40.31 ± 4.45 < 0.05	49.35 ± 3.79 > 0.05
Опыт	M ±m P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	28.12 ± 1.45 < 0.001 < 0.05	48.31 ± 1.04 < 0.01 > 0.05	59.31 ± 3.47 > 0.05 > 0.05

Таблица (продолжение)

**Влияние МИГУ-1 на динамику изменения содержания продуктов ПОЛ и основных компонентов антиоксидантной системы в коре головного мозга крыс с гипоксией замкнутого пространства (n=6)**

Глутатион восстановленный (мкмоль/л)				
Интактные	M ±m	28.0 ±1.0		
Контроль	M ±m	25.0 ± 1.0	11.0 ± 1.0	22.0 ± 1.0
	P <sub>1</sub>	> 0.05	< 0.01	< 0.05
Опыт	M ±m	26.0 ± 1.0	18.0 ±1.0	26.0 ± 1.0
	P <sub>1</sub>	> 0.05	< 0.01	> 0.05
	P <sub>2</sub>	>0.05	< 0.01	> 0.05
SH-группы (ммоль/г)				
Интактные	M ±m	2.50 ± 0.20		
Контроль	M ±m	2.11 ± 0.27	1.53 ± 0.24	1.59 ± 0.12
	P <sub>1</sub>	> 0.05	< 0.05	< 0.01
Опыт	M ±m	2.44 ± 0.29	1.80 ± 0.09	2.50 ± 0.19
	P <sub>1</sub>	> 0.05	< 0.05	> 0.05
	P <sub>2</sub>	> 0.05	> 0.05	< 0.01
ПРЭ ( % гемолиза)				
Интактные	M ±m	8.77 ± 1.70		
Контроль	M ±m	13.12 ± 1.17	17.89 ± 0.96	17.46 ± 1.84
	P <sub>1</sub>	> 0.05	< 0.01	< 0.01
Опыт	M ±m	11.06 ± 1.00	11.90 ± 0.85	11.78 ± 0.91
	P <sub>1</sub>	> 0.05	> 0.05	> 0.05
	P <sub>2</sub>	> 0.05	< 0.01	< 0.05

*Примечания:*P<sub>1</sub> - достоверность в сравнении с интактной группой животных;P<sub>2</sub> - достоверность в сравнении с контролем.

нии содержания ДК и ТБК-активных продуктов липидперекисления, что коррелирует с имеющимися литературными данными [7].

Как видно из таблицы, уже через 3 ч после извлечения животных из гермообъема уровень первичных продуктов липидперекисления, содержащих в своей структуре двойные ненасыщенные связи, увеличивается практически в 2 раза в сравнении с показателями у интактных крыс. В дальнейшем содержание ДК несколько снижается, однако остается достоверно повышенным до конца первых суток наблюдения.

Относительно динамики уровня конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2- тиобарбитуровой кислотой в коре головного мозга при моделируемой форме гипоксии, следует отметить, что наиболее выраженные изменения отмечаются через 6 ч наблюдения, когда

величина исследуемого показателя превышает таковую, регистрируемую у интактных животных, в 2 раза.

При изучении способности МИГУ-1 модифицировать процессы ПОЛ в коре головного мозга в условиях гипоксии замкнутого пространства было установлено, что предварительное введение данного вещества в значительной степени предупреждает накопление первичных продуктов ПОЛ в анализируемой структуре мозга в 1.3-3 раза. При этом уровень ДК в коре головного мозга опытной группы крыс во все изучаемые сроки приближается к показателям, регистрируемым у интактных животных.

Сходная картина отмечается и при анализе уровня конечных продуктов липидперекисления, содержание которых при введении изучаемого соединения уменьшается в

сравнении с контролем на 11 %, 42 %, 33 %, соответственно, в изучаемые сроки наблюдения (см. Табл.).

Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что МИГУ-1 обладает выраженной антиоксидантной активностью, реализуемой предупреждением образования и накопления продуктов липидперекисления в коре головного мозга крыс в условиях гипоксии замкнутого пространства.

Однако, известно, что состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза определяется не только интенсивностью процессов липидперекисления, но зависит от уровня и активности основных компонентов АОС.

Как показали проведенные исследования, в условиях гипоксии замкнутого пространства имеет место истощение резервов основных компонентов АОС во все изучаемые сроки (см. Табл.).

Так, воздействие на организм гипоксии замкнутого пространства приводит к резкому снижению активности каталазы в исследуемом биосубстрате в течение всего времени наблюдения. При этом необходимо отметить, что наиболее существенные изменения активности данного фермента отмечаются в начальный период реоксигенации (через 3 ч после завершения моделирования изучаемого патологического состояния). При этом, как видно из таблицы, активность каталазы снижается на 56 % от показателей, регистрируемых в интактной группе крыс. Предварительное же введение МИГУ-1 проявляется предупреждением от ингибирования каталазы в коре головного мозга опытных животных в динамике. Необходимо отметить, что разница показателей у интактных крыс и животных, которым предварительно вводили МИГУ-1, не имеет достоверных различий через 6 ч и 24 ч после завершения моделирования гипоксии замкнутого пространства.

Сходные результаты получены и при изучении динамики активности СОД в изучаемых условиях эксперимента. Проведенными исследованиями установлено, что наиболее существенное снижение активности данного фермента в ткани мозга у животных контрольной группы отмечается к 3-му часу исследования (активность СОД снижается на 64 %). В дальнейшем, через 6 ч и 24 ч после завершения моделирования изучаемого патологического состояния, показатели активности СОД имеют тенденцию к восстановле-

нию, хотя и остаются достоверно ниже регистрируемых у интактных животных.

Как следует из приведенных в таблице данных, профилактическое введение МИГУ-1 предупреждает снижение активности СОД в анализируемом биосубстрате в условиях моделируемой формы гипоксии. Причем, к концу первых суток наблюдения отличия активности СОД в опытной группе по сравнению с группой интактных животных не носят достоверного характера ( $P > 0.05$ )

Представленные и проанализированные данные убедительно свидетельствуют о протекторном действии МИГУ-1 в отношении компонентов ферментативного звена АОС. В дальнейшем, представляло существенный интерес изучить влияние данного соединения на состояние компонентов неферментативного звена АОС - глутатиона и SH-групп.

Анализируя данные динамики содержания восстановленного глутатиона в гомогенате коры головного мозга в контрольной группе животных, можно сделать вывод, что наиболее выраженные изменения изучаемого показателя отмечаются через 6 ч исследования (на 61 %) с последующим восстановлением его спустя 24 ч после реоксигенации.

Как видно из таблицы, профилактическое введение МИГУ-1 в изучаемых условиях эксперимента способствует практически полному сохранению резервов восстановленного глутатиона к 24 ч исследования. При этом, через 6 ч после извлечения животных из гермообъема содержание глутатиона в гомогенате коры головного мозга в опытной группе животных на 64 % выше по сравнению с контролем.

Результаты изучения содержания SH-групп в ткани мозга животных с гипоксией замкнутого пространства показали, что в изучаемых условиях эксперимента имеет место существенное (на 16-39 %) и достаточно длительное (до конца первых суток) снижение уровня тиоловых групп, практически не проявляя в динамике тенденции к восстановлению (см. Табл.).

В то же время, профилактическое введение МИГУ-1 животным опытной группы приводит практически к полному восстановлению изучаемого показателя в течение всего времени наблюдения, и лишь через 6 ч наблюдения отличия с группой интактных крыс становятся достоверными.

Результаты исследований по определению устойчивости мембран эритроцитов, как ин-

тегрального показателя обеспеченности организма эндогенными антиоксидантами в условиях окислительного стресса, представлены в таблице, из которой видно, что, через 3 ч наблюдения, происходит резкое увеличение процента гемолизированных эритроцитов в контроле, значительно превосходящее значения, идентифицируемые в крови интактной серии животных. Максимальные изменения отмечены к 6 ч изучения, когда процент гемолиза эритроцитов в крови контрольных крыс увеличивается в 2 раза по сравнению с таковым показателем у интактных животных. При этом обращает на себя внимание стойкость выявленных нарушений: к 24 ч определения не отмечено тенденции к нормализации данного показателя.

Оценивая данные относительно влияния исследуемого соединения на состояние перекисной резистентности эритроцитов, следует отметить резкое уменьшение (на 66 %) процента гемолиза эритроцитов в крови животных опытной группы через 6 ч и 24 ч с момента реоксигенации в сравнении с контролем, что свидетельствует о снижении свободно-радикальной агрессии. При этом значения изучаемого показателя в опытной группе не носят достоверных различий в сравнении с таковыми у интактных крыс в течение всего времени наблюдения.

### Выводы

Результаты проведенных комплексных исследований убедительно свидетельствуют о выраженных антиоксидантных свойствах координационного соединения германия с никотиновой кислотой (МИГУ-1), реализуемых в предупреждении активации процессов ПОЛ, и соответствующем сохранении фонда эндогенных антиоксидантов в коре головного мозга крыс в условиях гипоксии замкнутого пространства.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик Е.Ю., Лысенко Е.А., Савченкова Л.В. Сравнительная оценка состояния процессов липидперекисления в различных структурах мозга при острой церебральной ишемии на фоне комбинированного применения ацелизина и тиотриазолина // Буковинський медичний вісник. — 2001. - № 4. — С. 141-145.
2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. - № 1. — С. 16-18.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалев Ж.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. - 1990. - № 2. - С. 88-91.
4. Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В. Антигипоксиканты: состояние и перспективы // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1998. - № 4. - С. 72.
5. Методы исследования в профпатологии / Под ред. О.Г. Архиповой. — М.: Медицина, 1988. — 208 с.
6. Савченкова Л.В. Експериментальне обґрунтування шляхів лікарської профілактики гіпоксії замкнутого простору в нагрівачому мікрокліматі: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - К., 1999. — 36 с.
7. Савченкова Л.В. Биохимические основы патогенеза гипоксического синдрома // Укр. медичний альманах. - 1998. - № 1. - С. 90-99.
8. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии: Под ред. Ореховича В.И. - М.: Медицина, 1977. — С. 64-65.
9. Стальная И.Д., Гаршвили Г.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Там же. — С. 57-59.
10. Ellman G.L. Gissue sulphhydryl group // Arc.Biochem. Biophys. - 1959. — Vol. 25. - P. 70-77.
11. Sedlucck J., Lindsay H. Estimation of total proteinsound and nonproteine sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent // Analyt. Biochem. - 1969. - Vol 1. — P. 192-205.

Резюме  
Немятых О.Д.

### Вплив координаційної сполуки германію з нікотиновою кислотою на окисно-антиоксидантну рівновагу в мозку щурів із гіпоксією замкнутого простору

Проведено комплексні дослідження з вивчення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в корі головного мозку щурів на тлі профілактичного введення координаційної сполуки германію з нікотиновою кислотою в умовах гіпоксії замкнутого простору. Результати переконливо свідчать про виражену антиоксидантну активність сполуки, що вивчається.

Summary  
Nemyatykh O.D.

### Influence of germanium and nicotinic acid coordination compound on prooxidant - antioxidant balance in the brain of rats with closed space hypoxia

The complex research on studying of prooxidant - antioxidant homeostasis in rat cerebral cortex on the background of prophylactic introduction of germanium and nicotinic acid complex compound in the conditions of closed space hypoxia was carried out. The results obtained are the earnestly evidence of the expressed antioxidant activity of the compound being studied.

**Немятых Оксана Дмитриевна.** Аспирант кафедры фармакологии Луганского государственного медицинского университета.



## Маркетингові дослідження

УДК. 659.1:661.12

Пивень Е.П.

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

### Перспективы расширения номенклатуры комбинированных антигипертензивных средств за счет препаратов из группы ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента

Предложен перечень перспективных для разработки и производства комбинированных антигипертензивных препаратов, содержащих ингибиторы АПФ. Предлагаемые препараты по уровню прогнозируемых на них цен являются конкурентоспособными по отношению к ценам, сложившимся на украинском рынке, и покупательной способности населения. Прогнозируется высокий уровень спроса на них.

В настоящее время широкое клиническое применение в качестве средств первой линии в терапии гипертонической болезни находят препараты, тормозящие активность ренин-ангиотензиновой системы. Особое значение среди них принадлежит ингибиторам ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [1-10].

В последние годы за рубежом для лечения гипертонической болезни все более широко используются комбинированные антигипертензивные препараты, содержащие в своем составе не только ингибитор АПФ, но и другие лекарственные субстанции. Комбиниро-

вание ингибиторов АПФ с другими препаратами позволяет снизить частоту возникновения побочных эффектов и сохранить при этом их высокую терапевтическую эффективность [6].

Для усиления антигипертензивного эффекта ингибиторов АПФ чаще всего используются их комбинации с мочегонными средствами или блокаторами кальциевых каналов [6,8]. В таблице представлены сведения о присутствующих на мировом рынке комбинированных препаратах, содержащих ингибиторы АПФ, и применяемых для лечения гипертонической болезни.

Таблица

**Препараты, содержащие ингибиторы АПФ в комбинации с препаратами других фармакологических групп**

Ингибитор АПФ	Препарат, используемый в комбинации	Торговое название комбинированного препарата	Фирма - производитель
Беназеприл	Гидрохлортиазид	Лотензин (Lotensin)	Novartis Pharmaceutical Corp.
Беназеприл	Амлодипин	Лотрель (Lotrel)	Novartis Pharmaceutical Corp.
Каптоприл	Гидрохлортиазид	Капозид (Capozide)	Bristol Myers Squibb
Эналаприл	Дилтиазем	Текзем (Teczem)	Aventis Pharma
Эналаприл	Фелодипин	Лексел (Lexxel)	Astra Zeneca U.K.
Эналаприл	Гидрохлортиазид	Вазеретик (Vaseretic) (в Европе -Co-Renitec)	Merck & Co.
Фозиноприл	Гидрохлортиазид	Моноприл (Monopril НСТ)	Bristol Myers Squibb
Лизиноприл	Гидрохлортиазид	Zestoretic, Prinzide	Astra Zeneca U.K., Merck Research Laboratories
Моэксиприл	Гидрохлортиазид	Uniretic	Schwarz Pharma
Хинаприл	Гидрохлортиазид	Аккуретик (Accuretic)	Parke- Davis
Трандолаприл	Верапамил	Tarka	Knoll Pharma
Рамиприл	Фелодипин	Юнимакс (Unimax)	Astra Zeneca U.K.
Цилазаприл	Гидрохлортиазид	Инхибэйс (Inhibace)	Roche Products (New Zealand) Ltd
Периндоприл	Индапамид	Нолипрел	Les Laboratoires Servier

Из таблицы видно, что на мировом рынке антигипертензивных средств широко представлены комбинированные препараты, созданные на основе беназеприла, фозиноприла, лизиноприла, мозексиприла, хинаприла, трандолаприла, рамиприла, периндоприла, цилазаприла. Кроме ингибитора АПФ, как основной лекарственной субстанции, они включают другие компоненты, обладающие антигипертензивным действием. В качестве таковых чаще всего используются мочегонные препараты, наиболее широкое распространение из которых получил гидрохлортиазид, а также блокаторы кальциевых каналов (верапамил, фелодипин, амлодипин и дилтиазем).

Анализ украинского рынка комбинированных антигипертензивных средств из группы ингибиторов АПФ свидетельствует о его чрезвычайной ограниченности. При столь широком разнообразии комбинированных антигипертензивных препаратов этой группы на мировом рынке в Украине зарегистрировано лишь 8 их наименований [10]. Часть из них изготовлена на основе каптоприла, препарата первого поколения, обладающего сравнительно слабым антигипертензивным действием, и имеющим множество побочных эффектов. Другая часть - на основе эналаприла, препарата, фармакодинамические и фармакокинетические свойства которого также далеки от таковых у современных ингибиторов АПФ [3,6,8]. Все эти препараты помимо ингибитора АПФ содержат с своим составом диуретик — гидрохлортиазид.

Не вызывает сомнения, что в сложившейся на фармацевтическом рынке Украины ситуации возникает большая потребность в разработке новых препаратов данной группы и воспроизводстве уже существующих эффективных комбинаций, созданных на основе ингибиторов АПФ, к настоящему времени вышедших из-под патентной защиты. Учитывая это, нами экономически обосновывается целесообразность производства ряда перспективных комбинаций ингибиторов АПФ на отечественных предприятиях фармацевтической промышленности.

Одним из наиболее мощных антигипертензивных средств из группы ингибиторов АПФ, срок действия патентов на который в настоящее время истек, является лизиноприл. С 1998 года он входит в число 50 лидирующих по объему мировых продаж препаратов. По прогнозу зарубежных экспертов

объемы продаж лизиноприла и далее будут расти [11].

На мировом рынке существует комбинированный препарат, содержащий в своем составе лизиноприл и гидрохлортиазид (Zestoretic, Prinzide, производства «Astra Zeneca U.K.» и «Merck Research Laboratories»). Он обладает высоким терапевтическим действием и менее выраженными побочными эффектами в лечении артериальных гипертензий. По этой причине его воспроизводство (таблетки лизиноприла с гидрохлортиазидом) в Украине имеет реальные клинические и коммерческие перспективы.

Другим направлением в расширении отечественного рынка антигипертензивных средств может стать создание рациональных комбинаций, включающих диуретические средства других групп. Широко используемые в настоящее время в создании комбинированных препаратов тиазидные диуретики действительно обладают выраженным мочегонным действием. Однако их применение сопряжено с возникновением целого ряда побочных эффектов, появление которых обусловлено нарушением водно-солевого обмена в организме [6]. Возникновение этих побочных эффектов ограничивает клиническое использование препаратов данной группы. Подобный недостаток может быть устранен путем их замены на мочегонные средства растительного происхождения. Обладая выраженным терапевтическим эффектом, они значительно легче, чем их синтетические аналоги, переносятся больными. Учитывая вышеизложенное, представляется целесообразной разработка нового таблетированного препарата, содержащего эналаприл и экстракт можжевельника.

Особого внимания в вопросе расширения отечественной номенклатуры эффективных комбинированных антигипертензивных средств заслуживает разработка новых рациональных комбинаций ингибиторов АПФ с блокаторами кальциевых каналов. Как видно из таблицы, в состав уже существующих комбинированных препаратов, содержащих эналаприл в качестве блокаторов кальциевых каналов, включаются фелодипин или дилтиазем. Выраженной антигипертензивной активностью обладает также верапамил. Для этого препарата характерен мощный антигипертензивный эффект и, в отличие от фелодипина и дилтиазема, он реже вызывает побочные эффекты. Поэтому верапамил входит

в состав таблеток Тага производства «Knoll Pharma», созданных на основе трандолаприла.

Принимая во внимание вышеизложенное, представляется перспективной разработка для промышленного производства новой таблетированной лекарственной формы, содержащей эналаприл, вышедший из-под патентной защиты, и верапамил.

Для решения вопроса о целесообразности разработки и производства перспективных комбинированных препаратов, включающих в состав ингибиторы АПФ, нами был проведен детальный анализ их коммерческой перспективности. Особое внимание при этом было отведено оценке спроса на предлагаемые к производству препараты.

Для оценки возможного уровня спроса на предлагаемые препараты, был использован ряд информационных материалов, в числе которых статистическая отчетность Министерства здравоохранения Украины по заболеваемости, научные и маркетинговые литературные источники, а также информация об импорте препаратов-аналогов и объемах их выпуска отечественной промышленностью. Предварительная оценка позволяет прогнозировать следующий уровень спроса на данные препараты в год:

- таблетки лизиноприла с гидрохлортиазидом — 700.0 тыс упаковок;
- таблетки эналаприла с экстрактом можжевельника — 350.0 тыс упаковок;
- таблетки эналаприла с верапамилом - 400 тыс упаковок.

Оценка экономической целесообразности создания и организации производства комбинированных препаратов на основе ингибиторов АПФ основана на расчетах издержек и точек безубыточности производства, прогнозируемой оптовой цены по каждому препарату с учетом результатов конъюнктурного анализа украинского рынка. Для оценки экономической целесообразности создания и внедрения предложенных препаратов в производство был проведен прогноз оптовых цен и расчет безубыточности.

Прогноз оптовой цены на таблетки лизиноприла с гидрохлортиазидом показывает, что оптовая цена одной упаковки № 30 таблеток составляет 2.18 грн. при рентабельности 30 %. Следует иметь в виду, что по сравнению с уровнем текущих цен на другие комбинированные препараты ингибиторов АПФ с диуретиками, имеющимися в продаже (ди-

апазон цен от 3.83 грн до 47.54 грн), прогнозируемая оптовая цена на таблетки лизиноприла с гидрохлортиазидом является конкурентоспособной.

Анализ безубыточности выпуска таблеток лизиноприла с гидрохлортиазидом по цене 218 грн за одну упаковку показал, что для обеспечения покрытия полных затрат за счет выручки от реализации, предприятие должно продать не менее 191 тыс упаковок данного препарата. Расчет оптовой цены на таблетки эналаприла с экстрактом можжевельника показывает, что прогнозируемая оптовая цена одной упаковки № 30 таблеток в размере 2.91 грн при сложившейся в настоящее время конъюнктуре на фармацевтическом рынке Украины является конкурентоспособной по отношению к ценам аналогичных по действию препаратов. Данная прогнозируемая цена по сравнению с ценой наиболее дешевого импортного аналога энап-НЛ («КРКА», Словения) и отечественного препарата энафрил («Стирол», Украина) при пересчете на упаковку № 30 ниже в 5.8 и 2.5 раза, соответственно, что свидетельствует о ее конкурентоспособности по отношению к ценам аналогичных по действию препаратов.

Как показал анализ безубыточности выпуска таблеток эналаприла с экстрактом можжевельника по цене 2.91 грн за упаковку, для обеспечения покрытия полных затрат за счет выручки от реализации предприятие должно продать не менее 77 тыс упаковок.

Так как на украинском рынке в настоящее время отсутствуют препараты АПФ в сочетании с блокаторами кальциевых каналов, для сравнения прогноза оптовой цены на таблетки эналаприла с верапамилом в размере 3.37 грн за упаковку № 20, также как и в случае таблеток эналаприла с экстрактом можжевельника, приняты цены наиболее дешевых комбинированных аналогов. Результаты сравнения показали, что прогнозируемая цена на данный препарат будет в 1.4 раза ниже цены отечественного аналога и в 3.4 раза ниже цены импортного аналога по действию.

Анализ безубыточности выпуска таблеток эналаприла с верапамилом по цене 3.37 грн за одну упаковку свидетельствует, что для обеспечения покрытия полных затрат за счет выручки от реализации предприятие должно продать не менее 65 тыс. упаковок данного препарата.

Таким образом, как показали проведенные исследования, разработка и промышленное производство предложенных комбинированных препаратов ингибиторов АПФ являются коммерчески перспективным.

### Выводы

1. Комбинированные препараты на основе АПФ, присутствующие на рынке Украины, однообразны и имеют узкую номенклатуру. В их состав входит только каптоприл или эналаприл в сочетании с гидрохлортиазидом.

2. Экономически обоснована целесообразность производства в Украине комбинированных антигипертензивных препаратов, включающих в состав ингибиторы АПФ: таблеток лизиноприла с гидрохлортиазидом, эналаприла с экстрактом можжевельника и эналаприла с верапамилом.

3. Предлагаемые к разработке для промышленного производства комбинированные препараты по уровню прогнозируемых на них цен являются конкурентоспособными по отношению к уровню цен ингибиторов АПФ, сложившемуся на украинском рынке, и покупательной способности населения.

4. Уровень спроса на эти препараты будет находиться в пределах от 300 тыс упаковок в год до 700 тыс упаковок в год, а безубыточность производства - от 65 тыс упаковок до 191 тыс упаковок.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Метелица В.И. Жизненно важные антигипертензивные средства // Кардиология. - 1995. - Т. 35, № 7. - С. 69-85.
2. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В. О современной классификации ингибиторов ангиотензин-1-превращающего фермента // Кардиология. - 1998. - Т. 38, № 6. - С. 82 - 85.
3. Комиссаров И.В., Долженко А.П. Клиническая фармакология ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы // Лікування та діагностика. - 1997. - № 4. - С. 29-46.
4. Girerd Xavier. ACE inhibitors using for arterial hypertension therapy // Med. Ther. - 1998. - Vol.4, No.10. - P. 775-781.
5. Дзяк Г.В., Колесник Т.В. Место ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента в лечении артериальной

ной гипертензии // Укр. кардіол. журн. - 1998. - № 6. - С. 29 - 33.

6. Сидоренко Б.А. Ингибиторы АПФ в лечении артериальной гипертензии // Кардиология. - 1996. - Т.36, № 4. - С. 80-94.

7. Моисеев В.С. Сравнительная эффективность ингибиторов АПФ при артериальной гипертензии // Провизор. - 1998. - № 5. - С. 25- 37.

8. Преображенский Д.В. Физиология и фармакология ренин-ангиотензиновой системы // Кардиология. - 1997. - Т. 37, № 11. - С. 91-95.

9. Малая Л.Т. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в лечении артериальной гипертонии и хронической недостаточности кровообращения // Здоровье и питание. - 1998. - № 3-4. - С. 26 - 27.

10. Листопад А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента на рынке сердечно-сосудистых препаратов Украины // Провизор. - 1999. - № 24.- С. 35-37.

11. Варпаховская И. Официальные итоги 1998 фармацевтического года // Ремедиум. - 1999. - № 9. - С. 22-34.

### Резюме

Півень О.П.

### Перспективи розширення номенклатури комбінованих антигіпертензивних засобів за рахунок препаратів із групи інгібіторів ангиотензинперетворюючого ферменту

Пропонується перелік перспективних для розробки і виробництва комбінованих антигіпертензивних препаратів, що містять інгібітори АПФ. Запропоновані препарати за рівнем прогнозуємих на них цін є конкурентоспроможними по відношенню до цін, що склалися на українському ринку, та покупній спроможності населення. Прогнозується високий рівень попиту на них.

### Summary

Piven E.P.

### The perspectives of combined antihypertensive drugs assortment expansion owing to the drugs of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors

The list of combined antihypertensive drugs containing the ACE inhibitors and prospective for development and manufacturing is given. The drugs proposed are competitive on the level of predictable prices for ones in relation to the prices formed at the Ukrainian market and the purchasing capacity of population. The high level of demand for these drugs is forecasted.

**Півень Елена Петровна.** Окончила Харьковский инженерно-экономический институт (1977). Работает в ГНЦЛС. Зав. лаб. маркетинговых и технико-экономических исследований (1999). Канд. фарм. наук (1988).