

## Зміст

**До запровадження Державної Фармакопеї України**

<i>Гризодуб О.І., Леонтєв Д.А., Денисенко Н.В., Підпружников Ю.В.</i> Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту .....	3
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

**До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України**

Проект монографії «Гентаміцину сульфат» .....	18
-----------------------------------------------	----

**Фітохімічні дослідження**

<i>Литвиненко В.І., Бубенчиков Р.О.</i> Фенольні сполуки та полісахариди <i>Viola hirta</i> L. ....	23
<i>Янченко П.С., Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М.</i> Виділення та вивчення фурукумаринів деяких рослин родини Селерові та їх ліпазотропна активність .....	28

**Фармакологічні дослідження**

<i>Яковлєва А.В., Карбушева І.В., Лар'яновська Ю.Б.</i> Вивчення впливу елгацину на морфоструктуру міокарда здорових щурів різного віку .....	36
<i>Яковлєва А.В., Бондарев С.В., Маслова Н.Ф., Крамаренко О.О.</i> Порівняльна оцінка впливу нового ентеросорбенту - гранул цеоліту та сорбогелю на активність панкреатичних ферментів .....	41
<i>Деримевгій Л.В., Дем'яненко В.Г., Богрі Хамам Саліх, Дем'яненко Д.В.</i> Вивчення впливу препарату «Силіцетин» на перебіг експериментального тетрахлорметанового гепатиту .....	45

**Матеріали науково-практичної конференції****«Наукові досягнення у галузі створення лікарських засобів: технологія, аналіз, фармакологія»  
(квітень 2004 року)**

<i>Романова Я.Ю.</i> Біофармацевтичні дослідження при створенні нового комбінованого протитуберкульозного препарату у формі супозиторіїв .....	48
<i>Алмакаєв М.С., Шевченко І.В., Алмакаєва Л.Г., Буднікова Т.М.</i> Розробка комбінованого лікарського засобу для ін'єкцій місцевоанестезуючої дії .....	53
<i>Бегунова Н.В., Алмакаєва Л.Г.</i> Розробка складу та технології інфузійного препарату кардіотонічної дії на основі солей кислоти аспарагінової .....	56
<i>Довга І.М.</i> Дослідження впливу деяких фармацевтичних факторів на вивільнення парацетамолу із супозиторіїв .....	61
<i>Бондаренко О.В., Казарінов М.О., Пашнева Р.О.</i> Розробка технології одержання препарату у формі капсул на основі валеріани .....	66
<i>Янченко П.С.</i> Ліпазотропна активність субстанції піфламін та виділених із неї індивідуальних речовин фенольної природи .....	70

**Міжнародні конференції, семінари, виставки**

Інформація про XI Російський національний конгрес «Людина та ліки» .....	77
--------------------------------------------------------------------------	----

- Заст. головного редактора Спиридонов В.М. (д.фарм.н, професор)
- Рецензенти: к.фарм.н. Андрюкова Л.М.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; к.фарм.н. Деркач А.І.; к.фарм.н. Котов А.Г.; д.б.н., професор Маслова Н.Ф.; к.мед.н. Чайка Л.О.
- Випуск підготували Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Нестеренко Л.Л.
- Рекомендований до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 8 від 08.10.2004 р.
- Підписаний до друку 12.10.2004 р. Тираж 500 прим.

## Содержание

### К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

*Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпружников Ю.В.*

Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта ..... 3

### К изданию Дополнения 2 к Государственной Фармакопеи Украины

Проект монографии «Гентамицина сульфат» ..... 18

### Фитохимические исследования

*Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А.*

Фенольные соединения и полисахариды *Viola hirta* L. .... 23

*Янченко П.С., Ковалева А.М., Георгиевский Г.В., Комиссаренко А.Н.*

Выделение и изучение фурукумаринов некоторых растений семейства Селеровые и их липазотропная активность ..... 28

### Фармакологические исследования

*Яковлева Л.В., Карбушева И.В., Ларьяновская Ю.Б.*

Изучение влияния элгацина на морфоструктуру миокарда здоровых крыс разного возраста ..... 36

*Яковлева Л.В., Бондарев Е.В., Маслова Н.Ф., Крамаренко Е.А.*

Сравнительная оценка влияния нового энтеросорбента - гранул цеолита и сорбогеля на активность панкреатических ферментов ..... 41

*Деримедведь Л.В., Демьяненко В.Г., Богри Хамам Салих, Демьяненко Д.В.*

Изучение влияния препарата «Силицетин» на течение экспериментального тетрахлорметанового гепатита ..... 45

### Материалы научно-практической конференции

#### «Научные достижения в области создания лекарственных средств: технология, анализ, фармакология» (апрель 2004 года)

*Романова Я.Ю.*

Биофармацевтические исследования при создании нового комбинированного противотуберкулезного препарата в форме суппозиторий ..... 48

*Алмакаев М.С., Шевченко И.В., Алмакаева Л.Г., Будникова Т.Н.*

Разработка комбинированного лекарственного средства для инъекций местноанестезирующего действия ..... 53

*Бегунова Н.В., Алмакаева Л.Г.*

Разработка состава и технологии инфузионного препарата кардиотонического действия на основе солей кислоты аспарагиновой ..... 56

*Долгая И.Н.*

Исследование влияния некоторых фармацевтических факторов на высвобождение парацетамола из суппозиторий ..... 61

*Бондаренко О.В., Казаринов Н.А., Пашнева Р.А.*

Разработка технологии получения препарата в форме капсул на основе валерианы ..... 66

*Янченко П.С.*

Липазотропная активность субстанции пифламин и выделенных из нее индивидуальных веществ фенольной природы ..... 70

### Международные конгрессы, семинары, выставки

Информация о XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» ..... 77

## До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 543.544.615.01

Гриздуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпужников Ю.В.  
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»  
Государственная служба лекарственных средств и изделий медицинского назначения

### Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта

Предложена статистически обоснованная стандартизованная процедура проведения валидации методик количественного определения лекарственных средств методом стандарта. Схема апробирована на примере валидации методики количественного определения, контроля однородности содержания и растворения таблеток амброксола.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) [1], методики количественного определения лекарственных средств (испытания «Количественное определение», «Растворение» и «Однородность содержания»), включаемые в аналитическую нормативную документацию (АНД) на лекарственные средства (ЛС), должны быть валидированы.

Основными валидационными характеристиками этих методик являются линейность, правильность, точность, а также робастность. В соответствии с требованиями ГФУ [1], эти характеристики должны определяться с использованием следующих модельных образцов:

1. Линейность — не менее 5 концентраций, охватывающих весь диапазон аналитической методики ((80-120) % от номинального содержания для количественного определения, (70-130) % для однородности содержания и  $\pm 20$  % абсолютных от нормированной величины высвобождения).

2. Правильность — не менее 9 определений для трех различных концентраций, охватывающих весь диапазон методики.

3. Точность. Для сходимости — не менее 9 определений, охватывающих диапазон применения методики (три концентрации/три повтора), или не менее 6 определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

ГФУ рекомендует так планировать эксперимент, чтобы эти характеристики определялись одновременно [1], однако как это делать практически — неясно.

Неясно также, какими критериями приемлемости при этом надо руководствоваться. Данные вопросы в значительной степени были обсуждены нами ранее [2, 3]. Возможны и другие подходы. Следует отметить, что

систематическое применение критериев, учитывающих специфику ЛС, при проведении валидации методик анализа ЛС в научной литературе, по разным причинам, встречается достаточно редко. Это вызывает определенные трудности как у разработчиков АНД, так и у предприятий, формирующих регистрационные досье. Особенно серьезной данная проблема стоит перед предприятиями, которые переходят на требования GMP, поскольку валидация аналитических методик — одно из обязательных условий такого перехода.

Следует также отметить еще одну важную проблему отечественных АНД: они должны воспроизводиться в других лабораториях, в частности, в государственных контролирующих лабораториях. Данные лаборатории используют оборудование и лабораторную посуду, соответствующую ГФУ. В тот же время, на предприятиях может использоваться, например, гораздо более точная мерная посуда или спектрофотометр. Поэтому методика, валидированная в условиях предприятия, может давать неприемлемо большую неопределенность в условиях государственных лабораторий. Поскольку обширный межлабораторный эксперимент обычно невозможен, единственным выходом из данной ситуации является прогноз предельной неопределенности методики анализа. Хотя данный прогноз достаточно освещен в литературе [1, 4], систематического применения его при валидации методик анализа ЛС не описано.

Как видно, проведение валидации методик анализа ЛС нуждается в систематизации и выработке единого подхода. Решению данных вопросов и посвящена данная статья.

В дальнейшем рассмотрение ведется для количественного анализа в варианте «метода стандарта» — самого распространенного

метода анализа ЛС. Сюда относятся спектрофотометрия, жидкостная и газовая хроматография. Отдельные положения могут быть использованы и для прямых методов анализа, а также для контроля примесей.

Если нет особых указаний, то используют односторонние доверительные интервалы для вероятности 95 %.

## 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1.1. Общие требования к неопределенности аналитической методики

Максимально допустимая полная относительная неопределенность методики анализа лекарственного средства ( $\Delta_{As}$  %) связана с симметричными допусками содержания ( $\pm B$  %) анализируемого вещества соотношениями [1, 4]:

Субстанции:

$$\Delta_{As}(\%) \leq \max \Delta_{As} = B \quad (1)$$

Готовые лекарственные средства:

$$\Delta_{As}(\%) \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot B \quad (2)$$

### 1.2. Специфичность

В случае хроматографических методик анализа специфичность определяется степенью разделения пиков заданных веществ. В случае неспецифичных методик анализа (например, спектрофотометрия) подтверждение специфичности для решения поставленной задачи состоит в доказательстве того, что относительная систематическая погрешность ( $\delta_{noise}$  %), вносимая вспомогательными веществами и продуктами разложения в определение анализируемого вещества, является незначимой по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа ( $\Delta_{As}$  %). В частности, в случае спектрофотометрии, учитывая [4], получим:

$$\delta_{noise}(\%) = \frac{100 \cdot \sum_{i=1}^k A_{lm p, i}}{A^{st} + \sum_{i=1}^k A_{lm p, i}} \approx \quad (3)$$

$$\approx \frac{100 \cdot \sum_{i=1}^k A_{lm p, i}}{A^{st}} =$$

$$= \delta_{exc} + \delta_{imp} \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = \max \delta.$$

В числителе приведена сумма оптических плотностей (в разведении, принятом в методике анализа) всех примесей и вспомогательных веществ для их предельно допустимых

концентраций в препарате, а в знаменателе — оптическая плотность раствора сравнения в номинальной концентрации. Величина  $\max \Delta_{As}$  должна отвечать требованиям соотношений (1-2).

Величину  $\delta_{noise}$  можно представить в виде суммы вкладов, связанных со вспомогательными веществами ( $\delta_{exc}$ ) и примесями ( $\delta_{imp}$ ). Как видно из соотношения (3), величина  $\delta_{noise}$  не должна превосходить максимально допустимой систематической погрешности  $\max \delta$ .

Нередко возникает вопрос о том, в каком случае можно готовить модельные растворы для проверки линейности, точности и правильности без использования вспомогательных веществ (плацебо). Это возможно в том случае, когда вклад плацебо ( $\delta_{exc}$ ) в суммарную величину фонового поглощения ( $\delta_{noise}$ ) является незначимым, т.е., учитывая (2), выполняется соотношение [4]:

$$\delta_{exc} \leq 0.32 \cdot \max \delta = 0.32 \cdot 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.033 \cdot B. \quad (4)$$

### 1.3. Стабильность исследуемых растворов

Проверка стабильности исследуемого раствора и раствора сравнения является одним из элементов изучения робастности методики [1] и должна проводиться перед началом всех других валидационных исследований. Для этого изучают зависимость от времени аналитических сигналов (оптическая плотность, высота или площадь пика и др.) в условиях проведения методики анализа в течение выбранного промежутка времени ( $n_t$  точек). Для полученных величин сигналов рассчитывают среднее относительное стандартное отклонение ( $RSD_t$  %) и относительный доверительный интервал ( $\Delta_t$  %). Величина  $\Delta_t$  в условиях проведения методики анализа в течение выбранного промежутка времени должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой неопределенностью результатов анализа ( $\max \Delta_{As}$ ):

$$\Delta_t(\%) = t[95\%, (n_t - 1)] \cdot RSD_t \leq \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = \max \delta \quad (5)$$

Величина  $\max \Delta_{As}$  находится из соотношений (1-2).

### 1.4. Нормализованные координаты

Концентрации и аналитические сигналы (высота или площадь пика, оптическая плотность и др.) различных веществ могут находиться в самых разных цифровых диапазонах, что требует расчета критериев для каж-

дого конкретного случая и лишает их общности и наглядности (например, представление прямой линии в реальных концентрациях и площадях пиков). В то же время нас обычно интересуют концентрации и аналитические сигналы не в реальных величинах, а в процентах к номинальному (или нормируемому) значению, т.е. в так называемых «нормализованных» координатах. С практической точки зрения, именно в нормализованных координатах целесообразно и представлять концентрации и аналитические сигналы. Это позволяет сформулировать единые критерии, связанные только с допусками содержания, но не зависящие от специфики конкретных веществ.

Пусть  $C_i$  — концентрация анализируемого вещества в  $i$ -ом анализируемом растворе (или образце),  $C^{st}$  — концентрация этого же вещества в растворе сравнения (считается, что она очень близка к номинальной концентрации). Аналогично:  $A_i$  — аналитический сигнал анализируемого вещества для  $i$ -ого анализируемого раствора,  $A^{st}$  — аналитический сигнал этого же вещества для раствора сравнения. Введем нормализованные координаты  $X_i$  и  $Y_i$ , определив их следующим образом:

$$X_i = \frac{C_i}{C^{st}} \cdot 100\%, \quad Y_i = \frac{A_i}{A^{st}} \cdot 100\%. \quad (6)$$

При проведении валидационных исследований величины  $X_i$  и  $Y_i$  имеют ряд преимуществ перед исходными величинами  $C_i$ ,  $C^{st}$ ,  $A_i$ ,  $A^{st}$ :

1. Величины  $X_i$  и  $Y_i$ , независимо от специфики анализируемого вещества, всегда находятся в пределах одного и того же диапазона применения методики анализа в районе 100 %.

2. График линейной зависимости  $Y_i$  от  $X_i$  ( $Y_i = b \cdot X_i + a$ ), независимо от специфики анализируемого вещества, всегда лежит в одном и том же диапазоне (см. п. 1). Угол наклона прямой ( $b$ ) всегда близок к 1. Свободный член прямой ( $a$ ) незначимо (статистически или практически — см. ниже) отличается от 1 (что неудивительно, поскольку предполагается применимость метода стандарта). Это стандартизует представление графика линейной зависимости и делает его наглядным.

3. Прямая  $Y_i = b \cdot X_i + a$  характеризуется остаточным стандартным отклонением  $SD_{Y,rest}$ . Обратная линейная зависимость  $X_i = (1/b) \cdot Y_i + (-a/b) = b' \cdot Y + a'$  характеризуется остаточным стандартным отклонением  $SD_{X,rest}$ .

Учитывая близость угла наклона прямой ( $b$ ) к 1 и незначимость свободного члена ( $a$ ), получим:

$$SD_{Y,rest} \approx SD_{X,rest} = RSD_o. \quad (7)$$

Величины  $SD_{Y,rest}$  и  $SD_{X,rest}$  являются относительными стандартными отклонениями по отношению к номинальным значениям  $A^{st}$  и  $C^{st}$ , что подчеркнуто в выражении (7) величиной  $RSD_o$ .

4. Облако точек  $Y(X)$  в координатах  $Y$ - $X$  можно характеризовать стандартным отклонением  $SD_Y$  или  $SD_X$ . Так как средние значения величин  $X_i$  и  $Y_i$  ( $\bar{X}$  и  $\bar{Y}$ , соответственно) близки к 100 %, величины  $SD_Y$  и  $SD_X$  являются относительными (по отношению к номинальным значениям) стандартными отклонениями и, учитывая п. 2, близкими друг к другу, т.е.

$$SD_Y \approx SD_X = RSD_{range} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (X_i - \bar{X})^2}{g-1}} \quad (8)$$

Величины  $RSD_{range}$  для различных диапазонов применения приведены в Табл. 1.

#### 1.5. Диапазон применения аналитической методики и концентрации анализируемых модельных смесей

В соответствии с требованиями ГФУ [1, 5], диапазон применения в координатах  $Y_i$  от  $X_i$  будет: (80-120) % (количественное определение), (70-130) % (однородность содержания).

В случае теста «Растворение» диапазон применения должен быть не уже  $\pm 20$  % абсолютных от нормированной величины растворения [1]. ГФУ регламентирует растворение (75-115) % от номинального значения [5], что соответствует диапазону (55-135) %. Следует отметить, что верхний предел растворения (115 %) ГФУ устанавливает, исходя из требований к однородности дозирования [6], поэтому, если в частной статье приведен только нижний предел растворения, то и в этом случае верхний предел не может быть выше 115 %. В некоторых частных статьях растворение нормируется более жестко, например, не менее 80 % (т.е. (80-115) %), что соответствует диапазону применения (60-135) %.

Поскольку «валидация — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения поставленных задач» [1], правильность и точность, а также линейность должны проверяться в условиях той методики анализа, которая валидируется.

Поэтому выражение «9 определений... (три концентрации/три повтора)» [1] означает анализ в условиях методики 9 концентраций, сгруппированных по три вокруг трех номинальных составов. Аналогично для выражения «9 определений для трех разных концентраций». В то же время не совсем понятно, как эти концентрации связаны с 5 концентрациями при проверке линейности. С практической точки зрения целесообразно, как это и рекомендует ГФУ [1], проводить определение всех валидационных характеристик (и критериев для них) из одних и тех же 9 растворов.

Таким образом, оптимальным можно считать использование  $g = 9$  модельных растворов. Их номинальные концентрации представлены в Табл. 1.

Данные концентрации  $X_i^0$  являются теоретическими. Фактические концентрации  $X_i$ , рассчитанные с учетом фактических величин  $C_i$  и  $C^{st}$  (т.е. фактических навесок, взятых для приготовления модельных растворов и раствора сравнения), всегда несколько отличаются от  $X_i^0$ .

### 1.6. Критерии приемлемости линейной зависимости

#### 1.6.1. Остаточное стандартное отклонение

Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой  $Y_i = b \cdot X_i + a$  равен  $t(95\%, g-2) \cdot RSD_o$  и представляет собой доверительный интервал неопределенности методики анализа ( $\Delta_{As}$ ), который должен удовлетворять неравенствам (1-2). Учитывая соотношение (7), а также [7], получим:

Субстанции:

$$\Delta_{As} = t(95\%, g-2) \cdot RSD_o \leq \max \Delta_{As} = B \quad (9)$$

Готовые лекарственные средства:

$$\begin{aligned} \Delta_{As} &= t(95\%, g-2) \cdot RSD_o \leq \\ &\leq \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot B \end{aligned} \quad (10)$$

Здесь  $g = 9$  — число растворов, использованных для построения линейной зависимости. Отсюда получим требования к остаточному стандартному отклонению точек вокруг прямой:

Субстанции:

$$RSD_o \leq B / t(95\%, g-2) \quad (11)$$

Готовые лекарственные средства:

$$RSD_o \leq 0.32 \cdot B / t(95\%, g-2) \quad (12)$$

Для нашего случая  $g = 9$  точек,  $t(95, 7) = 1.8946$  [7] получим:

Субстанции:

$$RSD_o \leq 0.53 \cdot B \quad (13)$$

Готовые лекарственные средства:

$$RSD_o \leq 0.17 \cdot B \quad (14)$$

Для тестов «Однородность содержания» и «Растворение» предельная неопределенность анализа составляет  $\Delta_{As} = 2.96\%$ , что соответствует формальным допускам содержания  $B = 9.26\%$  [8]. Данную величину и следует подставлять для данных тестов в соотношение (14).

#### 1.6.2. Коэффициент корреляции

Общий коэффициент (индекс) корреляции  $R_c$  [7] рассчитывается, учитывая уравнение (7-10), из соотношения:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{RSD_o^2}{RSD_{range}^2}} \quad (15)$$

Подставляя в уравнение (15) величины  $RSD_{range}$  из Табл. 1 и учитывая соотношения (13-14), получим критические (минимальные) значения коэффициента корреляции  $R_c$  для различных испытаний, 9 точек и различных допусков содержания  $B$  (Табл. 2).

Иногда удобно проводить валидацию методики, которая была бы пригодна одновременно для проведения количественного определения, проверки однородности содержа-

Таблица 1

#### Номинальные концентрации (величины $X_i^0$ ) модельных растворов

Величины $X_i^0$ (%)									$\bar{X}_o$	$RSD_{range}$
Количественное определение (диапазон (80-120) %)										
80	85	90	95	100	105	110	115	120	100	13.69
Однородность содержания (диапазон (70-130) %)										
70	77.5	85	92.5	100	107.5	115	122.5	130	100	20.54
Тест «Растворение» (диапазон (55-135) %)										
55	65	75	85	95	105	115	125	135	95	27.39
Тест «Растворение» (диапазон (60-135) %)										
60	69.4	78.8	88.1	97.5	106.9	116.3	125.6	135	97.5	25.67

ния и выполнения теста «Растворение». В этом случае для данных допусков содержания (B) необходимо брать минимальные (из требований для количественного определения и для проверки однородности содержания и теста «Растворение») значения  $RSD_o$ , критические значения  $a$  для теста «Растворение» (как для имеющего наименьший нижний предел диапазона), а критические значения коэффициента корреляции рассчитывать из этих величин и реального максимально широкого диапазона (Табл. 1). Результаты таких расчетов также приведены в Табл. 2.

Из Табл. 2 видно, что критические значения коэффициента корреляции уменьшаются с ростом допусков и увеличиваются с расширением диапазона применения методики

и сами по себе, без указания этих факторов, мало информативны.

1.6.3. Свободный член. Статистическая и практическая незначимость

Отрезок, отсекаемый на оси ординат (свободный член прямой —  $a$ ), характеризует систематическую погрешность при анализе методом стандарта. Требования к нему могут быть двух типов:

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

Статистическая незначимость:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \cdot s_b = 1.895 \cdot s_a, \quad (16)$$

где:

Таблица 2

**Критические значения систематической и полной неопределенности методики анализа и параметров линейной зависимости  $Y_i = b \cdot X_i + a$  для различных испытаний,  $g = 9$  точек и различных допусков содержания B (КО — количественное определение, ОС — однородность содержания, P — тест «Растворение»)**

Испытание	Диапазон применения методики, %	Допуски содержания (B), %	Предельная неопределенность $\max \Delta_{As}$ %	Предельная систематическая погрешность $\max \delta$ %	Критическое значение $RSD_o$ , %	Критическое значение $R_c$	Критическое практически незначимое значение $a$ , %
<b>Субстанции</b>							
КО	80-120	1.0	0.32	0.10	0.53	0.99926	1.6
		1.5	0.48	0.15	0.79	0.99833	2.4
		2.0	0.64	0.20	1.06	0.99702	3.2
		2.5	0.80	0.26	1.32	0.99535	4.0
		3.0	0.96	0.31	1.58	0.99329	4.8
<b>Готовые лекарственные средства</b>							
КО	80-120	0.51	0.84	0.99810	2.6		
		0.77	1.27	0.99571	3.8		
		1.02	1.69	0.99236	5.1		
		1.54	2.53	0.98273	7.7		
		20	6.40	2.05	3.38	0.96909	10.2
ОС	70-130	9.26	2.96	0.95	1.56	0.99710	3.1
P	55-135	9.26	2.96	0.95	1.56	0.99839	2.1
	60-135	9.26	2.96	0.95	1.56	0.99837	2.4
КО + ОС + P	55-135	5	1.60	0.51	0.84	0.99952	2.1
		7.5	2.40	0.77	1.27	0.99893	2.1
		10	3.20	1.02	1.56	0.99837	2.1
		15	4.8	1.54	1.56	0.99837	2.1
		20	6.40	2.05	1.56	0.99837	2.1
КО + ОС + P	60-135	5	1.60	0.51	0.84	0.99946	2.4
		7.3	2.34	0.75	1.23	0.99885	2.4
		7.5	2.40	0.77	1.27	0.99878	2.4
		10	3.20	1.02	1.56	0.99814	2.4
		15	4.80	1.54	1.56	0.99814	2.4
		20	6.40	2.05	1.56	0.99814	2.4

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

Отметим, что требования статистической незначимости зависят от точности методики анализа — чем она выше (например, за счет большого числа параллельных измерений или точек прямой), тем меньшие значения  $a$  являются статистически значимыми. Наоборот, загроуляя результаты (например, уменьшая число точек прямой), можно сделать величину  $a$  незначимо отличающейся от нуля.

2) Практически незначимое отличие от нуля: величина  $a$  является практически незначимой для решения поставленной задачи. Как показано [2, 3], критерий практической незначимости величины  $a$  для метода стандарта, с учетом использования нормализованных координат, имеет вид:

Практическая незначимость:

$$a \leq \left| \frac{0.32 \cdot \Delta_{As,r}}{1 - (X_{\min} / 100)} \right| = \left| \frac{\max \delta}{1 - (X_{\min} / 100)} \right| \quad (17)$$

где:

$X_{\min}$  — минимальная граница диапазона применения методики (в нашем случае 80 %, 70 % или 55 %); величина  $\Delta_{As}$  должна удовлетворять соотношениям (1-2).

Выражение (17) применяют только в том случае, когда не выполняется критерий статистической незначимости (16). Критические значения  $a$  приведены в Табл. 2.

### 1.7. Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

Данные величины не являются обязательными при проведении валидации количественных методик, но могут быть полезны как информация о том, насколько диапазон применения аналитической методики превосходит ее предельные возможности. В соответствии с ГФУ [1], ПО и ПКО могут быть рассчитаны из стандартного отклонения свободного члена линейной зависимости  $s_a$  и угла наклона  $b$ :

$$ПО = 3.3 \cdot s_a / b \approx 3.3 \cdot s_a \quad (18)$$

$$ПКО = 10 \cdot s_a / b \approx 10 \cdot s_a, \quad (19)$$

учитывая близость в нормализованных координатах величины  $b$  к единице.

Если линейная зависимость строилась в нормализованных координатах (т.е.  $Y_i = b \cdot X_i + a$ ), величины ПО и ПКО определяют в процентах к концентрации раствора сравнения, что позволяет легко оценить «запас прочности» методики.

## 1.8. Точность

### 1.8.1. Сходимость

Основное уравнение метода стандарта, с учетом (6), имеет вид [9]:

$$X_i(\text{found}) = Y_i, \quad (20)$$

где  $X_i(\text{found}) = Y_i$  представляет собой найденную концентрацию  $i$ -ого исследуемого раствора в процентах к концентрации раствора сравнения. С другой стороны, введенная концентрация этого же раствора в процентах к концентрации раствора сравнения равна  $X_i$ . Таким образом, найденная концентрация к введенной, в процентах, равна:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\% \quad (21)$$

Величины  $Z_i$  характеризуются средним значением  $\bar{Z}$  и стандартным отклонением  $SD_Z$ , которое, учитывая близость величины  $\bar{Z}$  к 100 %, фактически является относительным стандартным отклонением. Поэтому методика анализа во всем диапазоне концентраций характеризуется доверительным интервалом, равным доверительному интервалу единичного значения  $Z$ :

$$\Delta_{As} = t(95\%, g - 1) \cdot SD_Z \leq \max \Delta_{As} \quad (22)$$

Методика является корректной, если для  $\Delta_{As}$ , рассчитанной по соотношению (22), выполняются требования (1-2).

### 1.8.2. Внутрिलाбораторная точность

Анализируют по методике  $n$  образцов одной и той же серии исследуемого препарата в  $m$  разных дня. Исследования проводят разные аналитики, на разном оборудовании (спектрофотометры, хроматографические колонки и др.). Все полученные результаты принадлежат одной и той же генеральной совокупности. Поэтому для всех результатов рассчитывают единое среднее значение ( $Z_{\text{intra}}$ ), относительное стандартное отклонение ( $RSD_{\text{intra}} \%$ ) и относительный доверительный интервал ( $\Delta_{\text{intra}} \%$ ) для 5 параллельных измерений (которые были в каждом опыте). Величина  $\Delta_{\text{intra}}$  не должна превосходить максимально допустимой неопределенности аналитической методики, т.е. [7]

$$\begin{aligned} \Delta_{\text{intra}} &= t[95\%, (n \cdot m - 1)] \cdot RSD_{\text{intra}} / \sqrt{5} = \\ &= 1.761 \cdot RSD_{\text{intra}} / \sqrt{5} = \\ &= 0.79 \cdot RSD_{\text{intra}} \leq \max \Delta_{As} \end{aligned} \quad (23)$$

Величина  $\max \Delta_{As}$  должна соответствовать требованиям (1-2) и Табл. 2.



1.9. Правильность

Методика не должна иметь значимой систематической погрешности. Это означает, что величина

$$\delta\% = |Z - 100| \quad (24)$$

должна незначимо отличаться от нуля. Эта незначимость может быть статистической или практической (см. п. 1.6.3).

1.9.1. Статистическая незначимость

Величина  $\delta$  должна статистически незначимо отличаться от нуля. Это означает, что она не должна превосходить доверительный интервал среднего значения  $\bar{Z}$ , т.е., учитывая (22), а также  $g = 9$ , должно выполняться неравенство [7]:

$$\delta \leq \Delta_{\bar{Z}} = \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{g}} = \frac{\Delta_{As}}{3} \quad (25)$$

Из соотношения (25) видно, что критерий статистической незначимости систематической погрешности зависит от фактической неопределенности анализа  $\Delta_{As}$ , ужесточаясь с ее уменьшением (т.е. с повышением точности).

1.9.2. Практическая незначимость

В том случае, когда методика анализа характеризуется высокой сходимостью результатов, т.е.  $\Delta_{As}$  гораздо меньше критических значений неравенств (1-2), соотношение (22) может не выполняться, т.е. методика характеризуется статистически значимой систематической погрешностью. Однако эта статистически значимая систематическая погрешность может быть практически незначима для решения поставленной задачи, т.е. незначима по сравнению с максимально допустимой общей неопределенностью анализа  $\Delta_{As}$ . Учитывая принцип незначимости [4], а также неравенства (1-2), получим:

Субстанции:

$$\delta \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot B = \max \delta \quad (26)$$

Готовые лекарственные средства:

$$\delta \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.10 \cdot B = \max \delta \quad (27)$$

Из соотношений (26-27) видно, что критерий практической незначимости зависит только от допусков содержания, но не зависит (в отличие от статистической незначимости) от фактической неопределенности анализа  $\Delta_{As}$ . Величины  $\max \delta$  приведены в Табл. 2.

Из сравнения (19) с (26-27) видно, что если фактическое  $\Delta_{As}$  близко к предельному значению (1-2), то соотношения (25) и (26-27) при

$g = 9$  практически эквивалентны. Однако, если фактическое  $\Delta_{As}$  гораздо меньше предельного значения (1-2), то требования (26-27) становятся существенно более либеральными чем (25).

1.10. Прогноз полной неопределенности методики количественного определения

Как уже говорилось выше, для подтверждения корректности методики при воспроизведении в другой лаборатории необходим прогноз полной неопределенности методики. Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа не должна превышать максимально допустимую неопределенность результатов анализа  $\max \Delta_{As}$  (Табл. 2). Полную прогнозируемую неопределенность рассчитывают по формуле [4, 7]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \quad (28)$$

где

$\Delta_{SP}$  — неопределенность пробоподготовки;

$\Delta_{FAO}$  — прогнозируемая неопределенность измерений (конечная аналитическая операция);

Неопределенность пробоподготовки  $\Delta_{SP}$  рассчитывают по формуле [1, 4, 7]:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{\sum_i^n \Delta_{V,i}^2}, \quad (29)$$

где  $\Delta_{V,i}$  — составляющая неопределенности, связанная с конкретной операцией пробоподготовки (взятие навески, аликвоты малого объема, доведение до объема в мерной колбе и др.), выраженная как односторонний относительный доверительный интервал для вероятности 95 %. В качестве таких составляющих, которые определяются из расчетной формулы, целесообразно использовать предельную неопределенность мерной посуды, рекомендованную ГФУ [1, 4, 7].

Неопределенность конечной аналитической операции  $\Delta_{FAO}$  можно рассчитывать разными путями. В случае хроматографических методик целесообразно исходить из предельного относительного стандартного отклонения параллельных хроматографирований, регламентированного разделом «Пригодность хроматографической системы» [4, 7, 8]. В случае спектрофотометрического анализа такие требования к повторным измерениям оптической плотности с выниманием кювет обычно отсутствуют, хотя рекомендации (не более 0.25 %) имеются [2]. Поэтому при прогнозе  $\Delta_{FAO}$  следует использовать величину

( $RSD_A = 0.52\%$ ) относительного стандартного отклонения оптической плотности с выниманием кюветы, полученную при обширном межлабораторном эксперименте в рамках 3 Раунда Программы профессионального тестирования лабораторий по анализу качества ЛС [10]. Данная величина характеризует ту реальную точность, которая в настоящее время достижима в отечественных государственных лабораториях.

Учитывая наличие испытуемого раствора и раствора сравнения, а также рекомендации ГФУ [9] о не менее 3 параллельных измерениях оптической плотности с выниманием кюветы для каждого раствора, получим для спектрофотометрического анализа [7, 10]:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_A \cdot 1.645}{\sqrt{3}} = 1.34 \cdot RSD_A = 1.34 \cdot 0.52 = 0.70\% \quad (30)$$

где:

1.645 — коэффициент Гаусса для одностронней вероятности 95 % [7].

Выражение (30) характеризует ту неопределенность конечной аналитической операции спектрофотометрического анализа, которая характерна в настоящее время для отечественной системы лабораторий по анализу качества ЛС.

### 1.11. Передача методики

Передача методик анализа является обязательным условием в том случае, когда валидацию проводит не само предприятие, а, например, научно-исследовательское учреждение по договору. Следует отметить, что данный этап является одной из важных составляющих проверки робастности (поскольку оборудование, мерная посуда, реактивы и исполнители на предприятии и в научно-исследовательском учреждении разные), а также межлабораторной воспроизводимости, дополняющий прогноз полной неопределенности анализа.

Передачу методики целесообразно проводить методом сравнительного анализа 5 образцов препарата по АНД на оборудовании предприятия.

### Критерии приемлемости

Целесообразно использовать «подтверждающий» подход: все значения содержаний, рассчитанные для 5 проанализированных образцов ( $Z_{i,Transfer}$ ), не должны отличаться от среднего значения ( $Z_{intra}$ ), найденного при проведении валидации при изучении внутри-

лабораторной точности (см. п. 1.8.2), более, чем на максимально допустимую неопределенность результатов анализа из Табл. 2:

$$\left| Z_{i,Transfer} - \overline{Z_{intra}} \right| \cdot 100\% \leq \max \Delta_{As} \quad (31)$$

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования для проверки предложенной схемы использовали таблетки амброксола гидрохлорида (АГХ) 0.030 г массой 0.100 г, содержащие в качестве вспомогательных веществ крахмал картофельный, сахар молочный и кальция стеарат. В соответствии с требованиями ГФУ [11] для данного лекарственного средства, кроме количественного определения, необходимо проводить также испытания «Однородность содержания» [6] и «Растворение» [5]. Все три методики количественного анализа проводятся при помощи прямой спектрофотометрии по собственному поглощению амброксола в 0.01 М растворе кислоты хлористоводородной при длине волны 244 нм, что позволяет провести для них одновременную валидацию.

При проведении исследований использовались субстанция АГХ, крахмал, лактоза и кальция стеарат, отвечающие требованиям Европейской Фармакопеи [12]. В качестве стандарта применялся ФСО ГФУ АГХ (с.120104). Используемые реактивы и титрованные растворы отвечали требованиям ГФУ.

Аналитическое оборудование: спектрофотометр Spesord 200, соответствовал требованиям ГФУ [9]; весы Sartorius MC 210S. Для работы использовалась мерная посуда класса А (первого класса), соответствующая требованиям ГФУ [1].

### 2.1. Валидируемые методики анализа

**Количественное определение.** Около 0.1 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 0.01 М раствора кислоты хлористоводородной, перемешивают в течение 10 мин, доводят объем раствора этой же кислотой до метки и фильтруют через фильтр «Милипор» с диаметром пор не более 0.5 мкм. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора 0.01 М раствором кислоты хлористоводородной до метки. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 244 нм,

используя в качестве компенсационного раствора 0.01 М раствор кислоты хлористоводородной.

Испытуемый раствор. Раствор препарата, приготовленный по методике АНД.

Раствор сравнения. 0.030 г (точная навеска) ФСО ГФУ АГХ помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл 0.01 М раствора кислоты хлористоводородной и далее поступают, как описано выше для испытуемого раствора.

Требования: (96.7 – 107.3) % от номинального содержания АГХ в препарате.

**Однородность дозирования.** Одну таблетку помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и далее поступают, как описано для количественного определения.

Требования: соответствие ГФУ [6].

**Растворение.** Среда растворения — 0.01 М раствор кислоты хлористоводородной, объем среды растворения — 1000 мл. Прибор с корзиной [5], скорость вращения — 100 об/мин, время растворения — 30 мин. В корзинку помещают одну таблетку.

Через 30 мин отбирают 25 мл жидкости и фильтруют через фильтр «Милипор» с диаметром пор не более 0.5 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 244 нм, используя в качестве компенсационного раствора 0.01 М раствор кислоты хлористоводородной.

Требования:  $\geq 80$  % от номинального содержания АГХ в препарате.

В соответствии с описанными требованиями к валидируемым методикам и Табл. 2, проводили валидацию методики, которая была бы одновременно пригодна для количественного определения, проверки однородности содержания и выполнения теста «Растворение» в диапазоне (60-135) %. Максимальная неопределенность анализа — 7.3 % (как для количественного определения). Соответствующие критерии приведены в Табл. 2.

## 2.2. Проверка незначимости фонового поглощения

### 2.2.1. Влияние плацебо

**Раствор плацебо (blank).** Готовили так же, как и раствор препарата, но вместо 0.1 г порошка препарата использовали 0.07 г смеси крахмала, лактозы и кальция стеарата в соответствующих соотношениях.

Измеряют оптическую плотность ( $A_{blank}$ ) раствора плацебо, делая не менее трех изме-

рений с выниманием кюветы. Параллельно измеряют оптическую плотность ( $A_{st}$ ) раствора сравнения. Было найдено:  $A_{blank} = 0.00114$ ;  $A_{st} = 0.7322$ . Вклад плацебо в суммарное поглощение препарата равен  $\delta_{exc} = 100 \cdot 0.00114 / 0.7322 = 0.16$  %.

### 2.2.2. Влияние продуктов разложения

Было проведено изучение профиля примесей в таблетках амброксола гидрохлорида, подвергнутых стрессовым воздействиям, по методике ВЭЖХ, описанной для субстанции АГХ [12]. Было показано, что он совпадает с профилем примесей самой субстанции АГХ (подробное рассмотрение этого вопроса выходит за рамки данной статьи). Поэтому для оценки влияния примесей на результаты количественного определения достаточно рассмотреть влияние примесей, описанных в монографии на субстанцию АГХ, с учетом нормирования их предельного содержания в таблетках амброксола.

Все примеси имеют сходный с амброксом хромофор [12], поэтому найденное внутренней нормализацией относительное содержание примесей (в процентах) методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором при длине волны 244 нм будет соответствовать их относительному вкладу ( $\delta_{imp}$ ) в оптическую плотность при количественном определении. Было найдено:  $\delta_{imp} = 0.50$  %.

## 2.3. Модельные растворы, выполнение измерений и расчеты

Поскольку раствор сравнения и модельные растворы готовились по одной и той же схеме, фактические величины  $X_i$  из соотношения (6) были равны отношению фактических навесок субстанции АГХ, взятых для приготовления данного модельного раствора и раствора сравнения. В Табл. 4 приведены фактические величины  $X_{i, \text{факт}}$ .

Проводили измерения оптической плотности каждого раствора с выниманием кюветы. Измерения проводили по следующей схеме: раствор сравнения (3 раза), модельные растворы 1-3 (по 3 раза), раствор сравнения (3 раза), модельные растворы 4-6 (по 3 раза), раствор сравнения (3 раза), модельные растворы 7-9 (по 3 раза), раствор сравнения (3 раза). В итоге получали 12 значений оптических плотностей для раствора сравнения и по 3 значения оптической плотности для каждого из 9 модельных растворов. Рассчитывают отношение средних значений оптических плотностей для каждого из 9 растворов к среднему значению оптической плотности

для раствора сравнения, получая величины  $Y_i = (A_i/A_{st}) \cdot 100$ . Находят также величину  $Z = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ , представляющую собой найденную концентрацию в процентах к введенной. Результаты расчетов представлены в Табл. 4. Критерии взяты из Табл. 2.

Расчеты параметров линейной зависимости  $Y = b \cdot X + a$  проводили методом наименьших квадратов [7]. Результаты расчетов - величины  $b$ ,  $s_b$ ,  $a$ ,  $s_a$ ,  $s_r$  (остаточное стандартное отклонение) и  $r$  (коэффициент корреляции) — представлены в Табл. 3, а полученная в нормализованных координатах прямая — на Рис. 1. Она довольно типична для всех случаев применения метода стандарта, независимо от специфики методики (спектрофотометрия, ВЭЖХ, ГХ).

#### 2.4. Внутрिलाбораторная точность

Исследования внутрिलाбораторной точности проводили на 5 пробах одной серии препарата. Проводят анализ для каждой пробы ( $i$ ) по АНД, выполняя по 3 параллельных измерения для каждого из растворов. Рассчитывают величины  $Z_i$  по соотношению (21) (опыт 1).

Проводят такой же анализ этой же серии с тем же числом параллельных проб (5) с другим аналитиком, в другие дни и с использованием другой мерной посуды (опыты 2 и 3). Объединяют найденные величины  $Z_i$ %, рассчитывают среднее значение и стандартное отклонение  $SD_{intra} \bar{Z}$  и проверяют выполнение соотношения (23). Полученные данные представлены в Табл. 5.

#### 2.4. Изучение стабильности

В АНД не регламентируется время, через которое проводится измерение оптической плотности, поэтому проверяли ее устойчивость в течение 1 ч [2]. Для этого измеряли по три раза с выниманием кюветы оптическую плотность испытуемого раствора ( $A$ ) и раствора сравнения ( $A_o$ ) сразу после приготовления растворов, через 15 мин, через 30 мин, через 45 мин и 60 мин. Результаты представлены в Табл. 6. Рассчитывали доверительный интервал и проверяли выполнение соотношения (5). В нашем случае (Табл. 2)  $\max \delta = 0.75\%$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### Специфичность

По данным п. 2.2.1 и 2.2.2 оценим суммарное влияние фона. В соответствии с уравне-

нием (3) получим:  $\delta_{noise} = \delta_{exc} + \delta_{imp} = 0.16 + 0.50 = 0.66\%$ . Из Табл. 2 для  $B = 7.3\%$  находим:  $\max \Delta_{As} = 2.34\%$ ,  $\max \delta = 0.75\%$ . Как видно,  $0.66\% \leq 0.75\%$ , т.е. соотношение (3) выполняется, фоновое поглощение является незначимым, и методика характеризуется достаточной специфичностью.

Кроме того, из соотношения (4) видно, что вклад плацебо ( $\delta_{exc} = 0.16\%$ ) является незначимым, т.к.  $0.16 \leq 0.033 \cdot 7.3 = 0.24\%$ . Таким образом, модельные растворы могут готовиться без плацебо, что и делалось в нашем случае.

#### Линейность

Как видно из Табл. 3, в нашем случае выполняются требования Табл. 2 к параметрам линейной зависимости, т.е. линейность методики подтверждается во всем диапазоне концентраций (60-135) %.

#### 3.3. Предел обнаружения и предел количественного определения

Расчеты предела обнаружения (ПО) и предела количественного определения (ПКО) АГХ проводили факультативно (поскольку ГФУ [1] не требует этого в данном случае) по соотношениям (18-19) по данным Табл. 4 на основе величин  $s_a$  и  $b$ :

$ПО = 3.3 \cdot 0.861 = 2.84\%$  от номинальной концентрации АГХ,

$ПКО = 10 \cdot 0.861 = 8.61\%$  от номинальной концентрации АГХ (0.03 мг/мл — по методике АНД).

Как видно, данные величины гораздо меньше нижней границы диапазона концентраций (60 %) и не могут поэтому влиять на точность анализа.

#### 3.4. Точность и правильность

##### 3.4.1. Сходимость и правильность

Из Табл. 4 видно, что методика анализа характеризуется достаточной сходимостью и правильностью во всем диапазоне концентраций (60-135) %.

##### 3.4.2. Внутрिलाбораторная точность

Как видно из Табл. 5, соотношение (23) выполняется, т.е. внутрिलाбораторная точность подтверждается.

##### 3.5. Стабильность растворов во времени

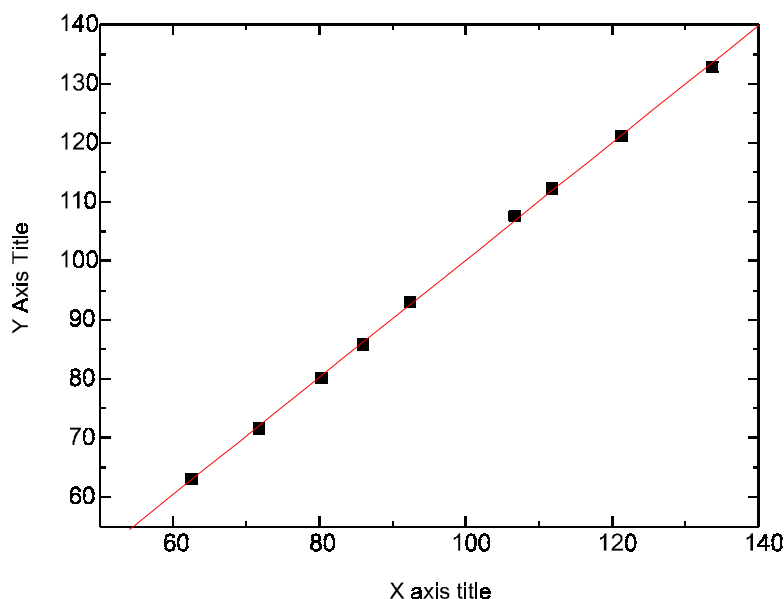
Как видно из Табл. 6,  $\Delta_i \leq \max \delta = 0.75\%$ , т.е. испытуемый раствор и раствор сравнения устойчивы в течение не менее 1 ч.

Таблица 3

Метрологические характеристики линейной зависимости

Величина	Значение	Критерии Табл. 2 (для допусков (92.7-107.3) %, число точек 9)	Вывод (соответствует или нет)
$b$	0.9937	-	-
$s_b$	0.0087	-	-
$a$	0.775	1) $\leq 1.8946 \cdot s_a = 1.63$ ; 2) если не выполняется 1), то $\leq 2.4$ ;	соответствует
$s_a$	0.861	-	-
$s_r$	0.584	$\leq 1.24$	-
$r$	0.99973	$\geq 0.99885$	соответствует

Рисунок 1



Линейная зависимость оптической плотности от концентрации амброксола гидрохлорида в нормализованных координатах

3.6. Прогноз полной неопределенности методики

Для подтверждения корректности методики при воспроизведении в другой лаборатории необходим прогноз полной неопределенности методики.

Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа не должна превышать максимально допустимой неопределенности результатов анализа из Табл. 2 для допусков содержания  $\pm 7.3\%$  ( $\max \Delta_{As} \leq 2.34\%$ ). Полную прогнозируемую неопределенность рассчитывают по формуле (28). В нашем случае неопределенность конечной аналитической операции (спектрофотометрии) известна: в соответствии с соотношением (30) она равна 0.70%. Поэтому рассчитаем неопреде-

ленность пробоподготовки, которая различается для разных количественных методик.

3.6.1. Прогноз неопределенности пробоподготовки

Расчеты проводили по соотношению (29), исходя из расчетной формулы АНД и используя подход и предельные неопределенности мерной посуды, описанные в [1, 4, 7].

3.6.1.1. Количественное определение

Расчетная формула:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot b}{D_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10} \cdot \frac{P}{100}$$

См. Табл. 7.

Таблица 4

Результаты анализа модельных смесей и их статистическая обработка (использованы критерии Табл. 2)

№ модельного раствора	Навески амброксола, мг ( $m_{sr} = 0.02974$ )	Введено в % к концентрации раствора сравнения ( $X_{i,факт.} \%$ )	Средние оптические плотности ( $A_i^{st} = 0.7322$ )	Найдено в % к концентрации раствора сравнения ( $Y_i \%$ )	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i / X_i) \%$
1.	0.01859	62.51	0.4619	63.07	100.9
2.	0.02134	71.77	0.5240	71.56	99.71
3.	0.02387	80.29	0.5871	80.18	99.86
4.	0.02555	85.92	0.6290	85.92	99.99
5.	0.02748	92.41	0.6812	93.03	100.68
6.	0.03170	106.62	0.7879	107.6	100.91
7.	0.03321	111.68	0.8224	112.31	100.56
8.	0.03607	121.29	0.8948	121.2	100.75
9.	0.03975	133.66	0.9725	132.82	99.37
среднее, $\bar{Z} \%$					100.30
относительное стандартное отклонение, $s_z \%$					0.58
относительный доверительный интервал $\Delta\% = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1.860 \cdot s_z =$					1.07
критическое значение для сходимости результатов $\Delta\% =$					2.34
систематическая погрешность $\delta =   \bar{Z} - 100  $					0.30
критерий незначимости систематической погрешности 1) $\delta \leq \Delta/3 = 0.73/3 = 0.243$ , 2) если не выполняется 1), то $\delta \leq 0.73$					не выполняется выполняется
общий вывод о методике:					корректна

Таблица 5

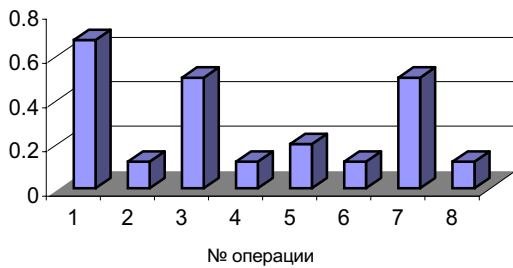
Результаты проверки внутрилабораторной точности

№ раствора	Величины $Z_i$		
	1 опыт	2 опыт	3 опыт
1	99.42	99.66	99.96
2	99.57	99.76	98.87
3	97.23	96.99	99.09
4	97.53	97.63	98.61
5	99.53	99.12	98.53
среднее	98.65	98.63	99.01
объединенное среднее $\bar{Z}_{intra} \%$	98.77		
$S_z (\%)$	1.17	1.25	0.57
$SD_z (\%)$	0.98		
$\Delta_{intra} \%$	$0.79 \cdot 0.98 = 0.77 < 2.34\%$		

Таблица 6

Стабильность растворов во времени

	$t, \text{ мин}$					Среднее	$RSD_t \%$	$A_t \%$	$\max \delta, \%$
	0	15	30	45	60				
$A_o$	0.7560	0.7567	0.7595	0.7592	0.7618	0.7586	0.307	0.65	0.75
$A$	0.7522	0.7527	0.7539	0.7549	0.7567	0.7541	0.238	0.51	



Из диаграммы видно, что наибольшую неопределенность в пробоподготовку вносит операция 1 — взятие навески СО амброксола 30 мг, а также операции 3 и 7 — взятие аликвоты 10 мл. Такое распределение составляющих неопределенности пробоподготовки является достаточно характерным.

**3.6.1.2. Однородность содержания**

См. Табл. 8.

**3.6.1.3. Растворение**

См. Табл. 9.

**3.6.2. Полная неопределенность аналитической методики**

*Количественное определение:*

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.02^2 + 0.70^2} = 1.24 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.34 \%$$

*Однородность содержания:*

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.06^2 + 0.70^2} = 1.27 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.34 \%$$

*Растворение:*

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.31^2 + 0.70^2} = 1.49 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.34 \%$$

Таблица 7

**Расчет неопределенности пробоподготовки для теста «Количественное определение»**

Операция пробоподготовки	Параметр расчетной формулы	Неопределенность [1]
<i>Раствор сравнения</i>		
1. взятие навески СО амброксола г/х	m <sub>0</sub>	0.2 мг/30 мг · 100 % = 0.67 %
2. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %
3. взятие аликвоты пипеткой 10 мл	10	0.5 %
4. доведение до объема в мерной колбе 100 мл	100	0.12 %
<i>Испытуемый раствор</i>		
5. взятие навески таблеток	m <sub>1</sub>	(0.2 мг/100 мг) · 100 % = 0.2 %
6. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %
7. взятие аликвоты пипеткой 10 мл	10	0.5 %
8. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.67^2 + 0.12^2 + 0.5^2 + 0.12^2 + 0.2^2 + 0.12^2 + 0.5^2 + 0.12^2} = 1.02 \%$$

Таблица 8

**Расчет неопределенности пробоподготовки для теста «Однородность содержания»**

Операция пробоподготовки	Параметр расчетной формулы	Неопределенность [1]
<i>Раствор сравнения</i>		
1. взятие навески СО амброксола г/х	m <sub>0</sub>	0.2 мг/30 мг · 100 % = 0.67 %
2. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %
3. взятие аликвоты пипеткой 10 мл	10	0.5 %
4. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %
<i>Испытуемый раствор</i>		
5. доведение до объема в мерной колбе 100 мл	100	0.12 %
6. взятие аликвоты пипеткой 5 мл	5	0.6 %
7. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 50 мл	50	0.17 %

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.67^2 + 0.5^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 0.6^2 + 0.17^2} = 1.06 \%$$

Таблиця 9

## Расчет неопределенности пробоподготовки для теста «Растворение»

Операция пробоподготовки	Параметр расчетной формулы	Неопределенность [1]
<i>Раствор сравнения</i>		
1. взятие навески СО амброксола г/х	$m_0$	0.2 мг/30 мг · 100 % = 0.67 %
2. доведение до объема в мерной колбе 100 мл	100	0.12 %
3. взятие аликвоты пипеткой 10 мл	10	0.5 %
4. доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	100	0.12 %
<i>Испытуемый раствор</i>		
5. взятие объема 1000 мл (мерный цилиндр)	1000	1.0 %

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.67^2 + 0.5^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 1.0^2} = 1.31 \%$$

Как видно, прогнозируемая полная неопределенность результатов для всех трех методик анализа не превышает критического значения (2.34 %), т.е. методики будут давать корректные результаты и в других лабораториях.

## 3.8. Робастність

При проверке робастности в случае спектрофотометрии следует изучить [1, 2]: стабильность растворов во времени, влияние рН, различных реактивов, субъективный фактор (различные аналитики). В нашем случае оптическая плотность в пределах  $\pm 10\%$  не зависела от кислотности раствора. Стабильность растворов подтверждает п. 3.5. Незначимость влияния реактивов, оборудования и субъективного фактора были подтверждены при передаче методики.

## Выводы

Предложена статистически обоснованная систематизированная рациональная стандартизованная процедура валидации методик количественного определения лекарственных средств методом стандарта. Схема апробирована на примере валидации методик количественного определения, контроля однородности содержания и растворения таблеток амброксола.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 58-67. — Доповнення 1. — 2004. — С. 2-4.
2. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. — 2002. - № 3. — С. 42-50
3. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В.. Критерии для параметров линейной зависимости при проведении валидации аналитических методик по ГФУ// Актуальні питання фармацевтичної і медич-

ної науки і практики: Зб. наук. ст. — Запоріжжя: Видавництво ЗДМУ, 2003. - Випуск X. - С. 30-32.

4. 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.

5. 2.9.3. Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. - 2004. — С. 66-70.

6. 2.9.6. Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу // Там же. — С. 71-73.

7. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Там же. — С. 187-214.

8. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г., Асмолова Н.Н., Вырова Е.В. Выполнение тестов «Однородность содержания» и «Растворение» хроматографическими методами при серийном контроле качества лекарственных средств. 1. Общая схема эксперимента // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. — 2004. — Том 2. - Випуск 1(5). — С. 24-34.

9. 2.2.25. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 36-41. - Доповнення 1. - 2004. — С. 1.

10. Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.Н. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях // Фармаком. — 2004. - № 2 — С. 20 - 34.

11. Таблетки // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 527-531.

12. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. — Supplement 4.8. - 2004. - CD-ROM version.

## Резюме

Гризодуб О.І., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Підпружников Ю.В.

**Стандартизована процедура валидації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту**

Запропоновано статистично обґрунтовану стандартизовану процедуру проведення валидації методик кількісного визначення лікарських засобів методом стандарту. Схему апробовано на прикладі валидації ме-



тодик кількісного визначення, контролю однорідності вмісту та розчинення таблеток амброксолу.

*Summary*

Gryzodub A.I., Leontiev D.A.,  
Denisenko N.V., Podpruzhnikov Yu.V.

**Standardized procedure of validation of assay procedures by the method of standard**

The statistically valid standartized procedure of validation of assay procedures by the method of standard was suggested. The plan was approved by the example of validation of assay procedures, control of uniformity of content and dissolution of Ambroxol tablets.

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

**Леонтьев Дмитрий Анатольевич** (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Работает в лаборатории хроматографии ГП ГНЦЛС (с 1993). Ст. науч. сотр. Руководитель группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». К.фарм.н. (1997).

**Денисенко Наталья Васильевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1997). Работает в отделе ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». Мл. науч. сотрудник группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология».

**Подпружников Юрий Васильевич.** Начальник Управления инспектората по надлежащей производственной, дистрибьюторской практике, контролю соблюдения лицензионных условий Государственной службы лекарственных средств и изделий медицинского назначения. Д.фарм.н.

*От редакції*

Авторы планируют продолжить публикацию сообщений по специфике проведения валидации различных методов анализа лекарственных средств.

## До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України

До Вашої уваги представлено проект переглянутої монографії «Гентаміцину сульфат» для Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України 1-го видання (ДФУ 1.2).

Проект монографії наданий до друку групою «Монографії на лікарські субстанції» (керівник групи — к.фарм.н. Георгієвський Г.В., відповідальний виконавець — наук. співр. Тихоненко Т.М.) відділу Державної Фармакопеї України ДП «Науково-експертний фармакопейний центр».

Вихідний варіант проекту представлений у відділі ДФУ к.х.н., ст. наук. співр. лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ Куліковим А.Ю.

Монографія «Гентаміцину сульфат» для Державної Фармакопеї України 1-го видання була розроблена на основі монографії *Gentamicin Sulphate, 0331* Європейської Фармакопеї 3-го видання та її Доповнень.

Від дня виходу ДФУ 1-го видання Європейська Фармакопея двічі, у ЄФ 4.5 (введено в дію з 01.01.03) та у ЄФ 4.8 (введено в дію з 01.07.04), вносила зміни у монографію *Gentamicin Sulphate, 0331*. У ЄФ 5-го видання (вводиться в дію з 01.01.2005) також передбачені певні зміни. Для збереження гармонізації з Європейською Фармакопеєю відповідні зміни мають бути внесені у ДФУ.

Представлений проект монографії (в європейській частині) відповідає монографії ЄФ 5-го вид.

Зміни, що пропонується внести у переглянуту монографію на гентаміцину сульфат, відображені у наведеній нижче Таблиці.

Таблиця

Розділ	Стара редакція (ДФУ 1-го видання)	Нова редакція (пропонується до введення у ДФУ 1.2)
<b>Європейська частина монографії</b>		
	<i>відповідає ЄФ 3-го видання</i>	<i>відповідає ЄФ 5-го видання</i>
<b>графічна формула</b>	відсутня	наведена як інформаційний матеріал
<b>вступна частина</b>	перелік компонентів відсутній	наведений перелік основних компонентів суміші сульфатів антибіотиків, продукованих <i>Micromonospora purpurea</i>
<b>межі вмісту</b>	антимікробна активність наведена в Одиницях дії (ОД)	антимікробна активність наведена в Міжнародних одиницях (МО)
<b>опис</b>		зазначено гігроскопічність
<b>розчинність</b>		виключено розчинність в ефірі
<b>ідентифікація</b> В. метод ТШХ	як тонкий шар використовують <i>силікагель Р</i> ;  рухома фаза: нижній шар суміші рівних об'ємів <i>метанолу Р</i> , <i>хлороформу Р</i> , розчину <i>аміаку концентрованого Р</i>	<i>ТШХ</i> пластинка із шаром <i>силікагелю Р</i> ;  рухома фаза: нижній шар суміші рівних об'ємів розчину <i>аміаку концентрованого Р</i> , <i>метанолу Р</i> , <i>метиленхлориду Р</i>
С. метод ВЕРХ в умовах визначення компонентного складу	на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 4 основні піки	на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 5 основних піків
<b>компонентний склад (метод ВЕРХ)</b>	визначається 4 компоненти гентаміцину  нормується вміст компонентів: С1 від 25.0 % до 50.0 %; С1а від 10.0 % до 35.0 %; суми компонентів С2, С2а: від 25.0 % до 55.0 %	наведена методика вимагає використання пульсуючого амперометричного детектора із золотим індикаторним електродом, хлорсрібним електродом порівняння та допоміжним електродом із нержавіючої сталі  визначається 5 компонентів гентаміцину  нормується вміст компонентів: С1 від 20.0 % до 40.0 %; С1а від 10.0 % до 30.0 %; суми компонентів С2, С2а, С2b: від 40.0 % до 60.0 %

Таблиця (продовження)

Розділ	Стара редакція (ДФУ 1-го видання)	Нова редакція (пропонується до введення у ДФУ 1.2)
супровідні домішки	розділ відсутній	метод ВЕРХ в умовах визначення компонентного складу препарату; нормуються супровідні домішки, що елюються перед гентаміцином сульфатом (будь-яка домішка: не більше 3 %; сума домішок: не більше 10.0 %)
стерильність		виключено
бактеріальні ендотоксини	не більше 1.67 МО/мг	менше 0.71 МО/ мг
зберігання	у повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці	у повітронепроникному контейнері
домішки		наведений перелік 5 домішок (домішки, що специфікуються, та інші домішки, що визначаються)
<b>Національна частина монографії</b>		
графічна формула	наведено графічну формулу	виключено (наведено в європейській частині монографії)
вступна частина	1 ОД відповідає 1 мкг гентаміцину	1 МО відповідає 1 мкг гентаміцину
опис	зазначено гігроскопічність	виключено (наведено в європейській частині монографії)
пірогени	Якщо субстанція призначена для виробництва парентеральних лікарських засобів без подальшої процедури видалення пірогенів, вона має витримувати випробування на пірогени. Уводять на 1 кг маси кролика 1 мл розчину, що містить 10 мг гентаміцину в 1 мл води для ін'єкцій Р.	виключено
аномальна токсичність	Якщо субстанція призначена для виробництва парентеральних лікарських засобів, вона має витримувати випробування на аномальну токсичність. Уводять кожній миші протягом 30 с 0.5 мг гентаміцину в 0.5 мл води для ін'єкцій Р. Термін спостереження 48 год.	виключено
маркування	При проведенні випробування "Пірогени" замість "-субстанція вільна від бактеріальних ендотоксинів" зазначають: - субстанція апірогенна.	виключено

*Коментар до таблиці*

У проекті монографії антимікробна активність субстанції виражається в Міжнародних одиницях (МО), що відповідає наведеним у ДФУ 1-го видання Одиницям дії (ОД).

У європейській частині проекту переглянутої монографії відсутні вимоги щодо стерильності гентаміцину сульфату. В Європейській Фармакопеї (відповідно й у Доповненні 1 до ДФУ 1-го видання) присутня стаття «Субстанції для фармацевтичного застосування» (її вимоги поширюються, насамперед, на субстанції, що описані у Фармакопеї), де зазначені вимоги щодо стерильності суб-

станцій, призначених для виробництва стерильних лікарських засобів без подальшої процедури стерилізації або кваліфікованих як стерильні. Тому вимоги щодо стерильності субстанції не дублюються у монографії.

У переглянутій статті змінено нормування бактеріальних ендотоксинів. У ДФУ 1-го вид. для субстанції гентаміцину сульфату був зазначений граничний вміст ендотоксинів — не більше 1.67 МО/мг, що обумовлено вищою разовою дозою гентаміцину сульфату, що існувала на той час, - 3 мг/кг · год. У наш час максимальна разова доза, що прийнята у міжнародній клінічній практиці, зростає до

7 мг/кг · год, що потребує більш жорсткої регламентації вмісту бактеріальних ендотоксинів – менше 0.71 МО/мг.

Звертаємо увагу, що зміна режиму дозування гентаміцину сульфату потребує від виробників ін'єкційної лікарської форми внесення змін у АНД на препарат у розділ «Бактеріальні ендотоксини».

Наявність пірогенів у субстанції контролюється тестом на бактеріальні ендотоксини. Випробування на бактеріальні ендотоксини достатньою мірою освоєне підприємствами-виробниками ін'єкційної лікарської форми гентаміцину сульфату. Тому для гентаміцину сульфату виключена можливість застосування випробування на пірогени на кроликах. Відповідно до цього із національної частини монографії виключений також розділ «Маркування».

Із метою більш повної гармонізації з Європейською Фармакопесю із національної частини монографії виключено контроль аномальної токсичності.

Текст представленої переглянутої монографії містить певні позначення:

- *трикутники* зазначають місце, де введена нова частина або текст був замінений або перероблений;
- *квадрат* зазначає місце, де частина тексту вилучена.

В обговоренні проекту брали участь Гризодуб О.І. (д.х.н., професор, заступник директора ДП НЕФЦ із наукової роботи), Леонт'єв Д.А. (ст. наук. співр. відділу ДФУ ДП НЕФЦ, к.фарм.н.), Жемерова К.Г. (керівник групи мікробіологічного контролю лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ), Меркулова Ю.В. (ст. наук. співр. лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, к.б.н.), Гомон О.М. (ст. наук. співр. лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, к.б.н.).

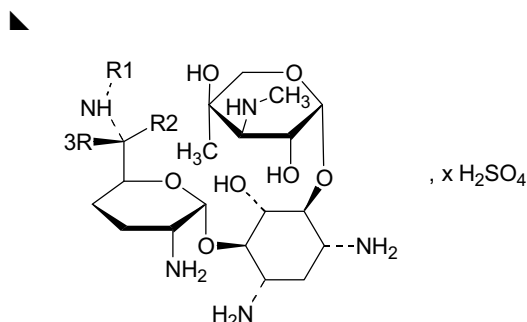
Зауваження та пропозиції щодо проекту можна направляти на адресу ДП «Науково-експертний фармакопейний центр» (відділ ДФУ) або журналу «Фармаком». Запрошуємо всіх зацікавлених осіб до відкритого обговорення проекту на форумі сайту журналу «Фармаком» [farmacomua.narod.ru](http://farmacomua.narod.ru).

## ПРОЕКТ

# ГЕНТАМІЦИНУ СУЛЬФАТ

Gentamicini sulfas

## GENTAMICIN SULPHATE



Gentamicin	Mol. Formula	R1	R2	R3
C1	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
C1a	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	H	H	H
C2	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
C2a	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
C2b	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H

Суміш сульфатів антибіотиків, продукуваних *Micromonospora purpurea*, основними компо-

нентами яких є гентаміцини C1, C1a, C2, C2a та C2b.

*Вміст:* не менше 590 МО/мг, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору. ▲ Гігроскопічний. ▲

**Розчинність.** Легко розчинний у воді *P*, практично не розчинний у 96 % спирті *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*Перша ідентифікація:* C, D.  
*Друга ідентифікація:* A, B, D.

**A.** Близько 10 мг субстанції розчиняють в 1 мл води *P* і додають 5 мл розчину 400 г/л кислоти сірчаної *P*. Нагрівають на водяній бані протягом 100 хв, охолоджують і доводять об'єм розчину водою *P* до 25 мл. Ультрафіолетовий спектр поглинання (2.2.25) одержаного розчину в області від 240 нм до 330 нм не повинен мати жодного максимуму.

**B.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 25 мг субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

**Розчин порівняння.** 25 мг ФСЗ гентаміцину сульфату розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** нижній шар суміші рівних об'ємів розчину аміаку концентрованого *P*, метанолу *P*, метиленхлориду *P*.

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл (50 мкг) випробовуваного розчину та 10 мкл (50 мкг) розчину порівняння.

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:** 2/3 довжини пластинки.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином нінгідрину *P1* і витримують при температурі 110 °С протягом 5 хв.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися три основні плями на рівні трьох основних плям на хроматограмі розчину порівняння, що відповідають їм за розміром і забарвленням.

**С.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Компонентний склад».

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 5 основних піків, що мають ті самі часи утримування, що і 5 основних піків на хроматограмі розчину порівняння (а).

**Д.** Субстанція дає реакцію (а) на сульфати (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Розчин S.** 0.8 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

**Прозорість розчину (2.2.1).** Розчин S має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за еталон 6 шкали найбільш підхожого кольору.

**pH (2.2.3).** Від 3.5 до 5.5. Вимірюють pH розчину S.

**Питоме оптичне обертання (2.2.7).** Від +107° до +121°, у перерахунку на безводну речовину.

2.5 г субстанції розчиняють у воді *P* та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

■ **Компонентний склад.** Рідинна хроматографія (2.2.29): використовують метод внутрішньої нормалізації; до розрахунку беруть тільки піки, що відповідають гентаміцинам C1, C1a, C2, C2a, C2b; для ідентифікації піків використовують хроматограму ФСЗ гентаміцину сульфату.

**Випробовуваний розчин.** 50 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тією самою рухомою фазою до 100.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** Вміст віали із ФСЗ гентаміцину сульфату розчиняють у рухомій фазі та доводять тією самою рухомою фазою до одержання розчину 0.5 мг/мл.

**Розчин порівняння (b).** 5.0 мл розчину порівняння (а) доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: сополімер стирол-дивінілбензолу *P* (8 мкм) із розміром пор 100 нм,
- температура: 55 °С.

**Рухома фаза:** суміш вода, вільна від вуглецю діоксиду, *P*, що містить 60 г/л натрію сульфату безводного *P*, 1.75 г/л натрію октансульфонату *P*, 8 мл/л тетрагідрофурану *P*, 50 мл/л 0.2 М розчину калію дигідрофосфату, pH якого попередньо доводять до 3.0 кислотою фосфорною розведеною *P* та дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Пост-колонковий розчин:** розчин натрію гідроксиду, вільний від карбонату, *P*, розведений 1:25, попередньо дегазований, що подається без пульсації у струмінь рухомої фази після колонки із використанням полімерної спіралі місткістю 375 мкл.

**Швидкість погавання розчину:** 0.3 мл/хв.

**Детектор:** пульсуючий амперометричний детектор або аналогічний із золотим індикаторним електродом, хлорсрібним електродом

порівняння та допоміжним електродом із нержавіючої сталі, що розташований у тілі комірки; витримують потенціал + 0.05 V детектора, + 0.75 V електродом окиснення, - 0.15 V електрода відновлення із пульсацією, що визначена для даного детектора.

Об'єм проби, що вводиться: 20 мкл.

Час хроматографування: у 1.2 рази більше часу утримування гентаміцину С1.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (а):

- відношення  $H_p$  до  $H_v$  має становити не менше 2.0, де  $H_p$  - висота піка гентаміцину С2а над базовою лінією,  $H_v$  - висота над базовою лінією самої низької точки хроматограми між даним піком і піком гентаміцину С2.

Нормування:

- гентаміцин С1: від 20.0 % до 40.0 %,
- гентаміцин С1а: від 10.0 % до 30.0 %,
- сума гентаміцинів С2, С2а, С2b: від 40.0 % до 60.0 %,
- не враховують: піки, площа яких відповідає площі піка гентаміцину С1 на хроматограмі розчину порівняння (b).

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у випробуванні «Компонентний склад».

Нормування: (для супровідних домішок, що елюються перед гентаміцином С1а):

- будь-яка домішка: не більше 3.0 %,
- сума домішок: не більше 10.0 %.

**Метанол** (2.4.24, система В). Не більше 1.0 %.

**Сульфати.** Від 32.0 % до 35.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

0.250 г субстанції розчиняють у 100 мл води дистильованої Р і доводять рН розчину до 11 розчином аміаку концентрованим Р. До одержаного розчину додають 10.0 мл 0.1 М розчину барію хлориду, близько 0.5 мг фталейнового пурпурового Р і титрують 0.1 М розчином натрію едгату, додаючи 50 мл 96 % спирту Р, коли забарвлення розчину почне змінюватися, і продовжують титрування до зникнення фіолетово-блакитного забарвлення.

1 мл 0.1 М розчину барію хлориду відповідає 9.606 мг  $SO_4$ .

**Вода** (2.5.12). Не більше 15.0 %. Визначення проводять із 0.300 г субстанції.

**Сульфатна зола** (2.4.14). Не більше 1.0 %. Визначення проводять із 0.50 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Менше  $\blacktriangle$  0.71 МО/мг  $\blacktriangleleft$ , якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять мікробіологічним методом (2.7.2).

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному, повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття.

## МАРКУВАННЯ

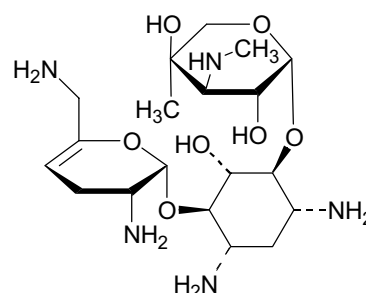
У необхідних випадках зазначають:

- субстанція вільна від бактеріальних ендотоксинів.

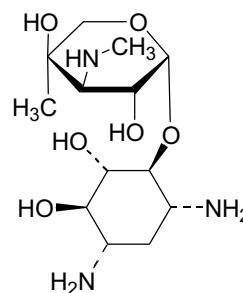
## ДОМІШКИ

Домішки, що специфікуються: **А, В, С.**

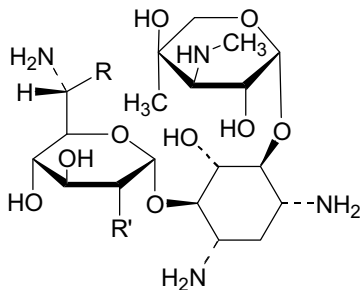
Інші домішки, що визначаються: **Д, Е.**



**А.** 2-деокси-4-О-[3-деокси-4-С-метил-3-(метиламіно)-β-Л-арабінопіранозил]-6-О-(2,6-діаміно-2,3,4,6-тетрадеокси-α-Д-гліцера-гекс-4-енопіранозил)-Л-стрептамін (сісоміцин),

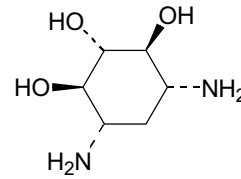


**В.** 2-деокси-4-*O*-[3-деокси-4-*C*-метил-3-(метиламіно)-β-*L*-арабінопіранозил]-*L*-стрептамін (гарамін),



**С.**  $R = CH_3$ ,  $R' = OH$ : 4-*O*-(6-аміно-6,7-дидеокси-*D*-гліцеро-α-*D*-глюко-гептопіранозил)-2-деокси-6-*O*-[3-деокси-4-*C*-метил-3-(метиламіно)-β-*L*-арабінопіранозил]-*D*-стрептамін (гентаміцин  $B_1$ ),

**Д.**  $R = H$ ,  $R' = NH_2$ : 2-деокси-4-*O*-[3-деокси-4-*C*-метил-3-(метиламіно)-β-*L*-арабінопіранозил]-6-*O*-(2,6-діаміно-2,6-дидеокси-α-*D*-глюкогексопіранозил)-*L*-стрептамін,



**Е.** 2-деоксистрептамін.

\_\_\_\_\_ **N**

■

1 МО відповідає 1 мкг гентаміцину.

■

**Депресорні речовини (2.6.11).** Якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування, вона має витримувати випробування на депресорні речовини.

## Фітохімічні дослідження

УДК 615:322:547.56:577.114

Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»  
Курский государственный медицинский университет, Россия

### Фенольные соединения и полисахариды *Viola hirta* L.

В статье приведены результаты исследования фенольных соединений и полисахаридов надземной части *Viola hirta* L. методами бумажной хроматографии, тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ. Указанными методами обнаружено 83 вещества фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами, фенолкарбоновыми кислотами. Фенольные соединения в данном растении идентифицированы впервые. Установлено, что углеводный комплекс надземной части *Viola hirta* L. представлен водорастворимыми полисахаридами, пектиновыми веществами, гемицеллюлозами; установлен их моносахаридный состав. Полисахариды травы *Viola hirta* L. выделены и исследованы впервые.

Растения рода Фиалка во флоре Центрального Черноземья представлены 20 видами [4]. Из них наибольшее распространение имеют фиалка полевая, фиалка собачья, фиалка опушенная, фиалка удивительная [4].

Химический состав их практически не изучен, в той или иной степени он изучен только у фиалки полевой [8].

Растения рода фиалка содержат фенольные соединения и полисахариды, обладающие широким спектром биологической активности. Полисахариды оказывают отхаркивающее, противовоспалительное, противоязвенное действие. Фенольные соединения

проявляют противовоспалительную, антиоксидантную, ранозаживляющую активность [14]. Фенольные соединения и полисахариды фиалки опушенной практически не изучены.

Целью нашей работы было изучение фенольного и полисахаридного состава фиалки опушенной.

#### Материалы и методы

Объектом исследования служила воздушно-сухая измельченная надземная часть фиалки опушенной, заготовленная в 2001-2003 годах в Курской области (окрестности г. Курска, урочище Знаменская роща; заповедник

«Стрелецкая степь») в период массового цветения растений.

Для выделения полифенольных соединений воздушно-сухое сырье фиалки опушенной измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. 100 г сырья экстрагировали в колбе с обратным холодильником 70 % спиртом этиловым в соотношении сырье - экстрагент 1:5 в течение 25-30 мин. Экстракцию проводили 3 раза. Объединенные извлечения упаривали под вакуумом до водного остатка, охлаждали, фильтровали (для отделения хлорофилла и смол). Фильтрат использовали для последовательной жидкостной экстракции органическими растворителями: хлороформом, этилацетатом, бутанолом. Жидкостную экстракцию проводили следующим образом: водный остаток спирто-водного извлечения обрабатывали 7-8 раз в делительной воронке равным объемом хлороформа. Объединенные хлороформные извлечения упаривали (хлороформная фракция). Водные остатки после экстракции хлороформом нагревали на водяной бане для удаления хлороформа, охлаждали и обрабатывали последовательно этилацетатом и бутанолом.

Для обнаружения фенольных соединений анализировали хлороформную, этилацетатную, бутанольную фракции, а также водный остаток с помощью качественных реакций и хроматографическими методами.

Обнаружение кумаринов проводили в хлороформных фракциях спирто-водных извлечений методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» с использованием в качестве подвижной фазы системы растворителей: бензол-этилацетат (2:1). Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки их специфическими реактивами (пары аммиака, 10 % раствор калия гидроксида в спирте этиловом) [5].

Для обнаружения фенолкарбоновых кислот использовали этилацетатную фракцию. Определение проводили путем хроматографирования на бумаге восходящим способом, используя в качестве подвижной фазы 2 % раствор кислоты уксусной. Хроматограммы обрабатывали специфическими реактивами: парами аммиака, 1 % спиртовым раствором железа окисного хлорида, диазотированным п-нитроанилином [1, 10].

Наличие флавоноидов в этилацетатных фракциях и водном остатке извлечения из травы фиалки опушенной определяли с помощью характерных качественных реакций

(цианидиновой пробы и цианидиновой пробы по Брианту, реакции с 2 % раствором алюминия хлорида и реакции с 10 % раствором натрия гидроксида) [2, 12, 13]. Положительные реакции свидетельствуют о присутствии флавоноидов в исследуемом сырье.

Также нами была использована хроматография на бумаге в системах растворителей: 15 % раствор кислоты уксусной, бензол — этилацетат — кислота уксусная (50:50:1) с использованием для проявления специфических реактивов (пары аммиака, 10 % раствор натрия гидроксида в спирте этиловом, 2 % раствор циркония хлорида в спирте метиловом) [10]. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами.

Для детального изучения компонентного состава фенольных соединений надземной части фиалки опушенной применяли метод ВЭЖХ. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с УФ-детектором фирмы «GILSTON» (Франция) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «МультиХром для Windows». Была использована металлическая колонка размером 4.6x250 мм PLATINUM EPS C 18 100 А. В качестве подвижной фазы использовали смесь: ацетонитрил — вода - кислота фосфорная концентрированная (400:600:5). Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0.8 мл/мин. Продолжительность анализа 109.22 мин. Детектирование проводилось при длине волны 254 нм.

Для исследования надземную часть фиалки опушенной измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. 10.0 г сырья помещали в аппарат Сосклет, прибавляли 50 мл 70 % спирта и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч с момента закипания. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем 70 % спиртом до метки (испытываемый раствор).

Параллельно готовили серию 0.05 % растворов сравнения флавоноидных соединений, кумаринов и фенолкарбоновых кислот в спирте метиловом.

Объем вводимой пробы 1 мкл.

Идентификацию проводили путем сопоставления времен удерживания компонентов смеси и растворов сравнения.

Из шрота, оставшегося после получения полифенольных соединений, последователь-



но выделяли полисахариды: водорастворимые полисахаридные комплексы, затем пектиновые вещества, гемицеллюлозу А (ГЦ А) и гемицеллюлозу Б (ГЦ Б).

Для получения водорастворимых полисахаридных комплексов (ВРПС) использовали воздушно-сухой шрот сырья после экстракции полифенольных соединений 70 % спиртом [3]. 200 г воздушно-сухого шрота экстрагировали 4 л горячей воды при нагревании до температуры 95 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Повторное извлечение полисахаридов проводили дважды при соотношении сырье - экстрагент 1:10. Растительный материал отделяли центрифугированием, а объединенные водные экстракты упаривали до 1/5 первоначального объема. Полисахариды осаждали трехкратным (по отношению к извлечению) объемом 96 % спирта при комнатной температуре. Выпавшие осадки отфильтровывали, промывали вначале 96 % спиртом, затем ацетоном, высушивали и взвешивали.

Из шрота, оставшегося после получения ВРПС, выделяли пектиновые вещества (ПВ). Экстракцию сырья проводили трехкратно смесью 0.5 % растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата (1:1) в соотношении 1:20 при температуре (80-85) °С в течение 2 ч. Объединенные экстракты концентрировали до 1/5 первоначального объема и осаждали пятикратным объемом 96 % спирта. Получен-

ные осадки отфильтровывали, промывали 96 % спиртом, высушивали и взвешивали.

Из шрота, оставшегося после выделения пектиновых веществ, выделили ГЦ А и ГЦ Б. Экстракцию проводили 10 % раствором натрия гидроксида в соотношении 1:5 при комнатной температуре в течение 12 ч. При прибавлении кислоты уксусной ледяной образовывался осадок ГЦ А, который отфильтровывали, высушивали и взвешивали. К фильтрату прибавляли двукратный объем 96 % спирта, при этом образовывался осадок ГЦ Б, который промывали 96 % спиртом, высушивали и взвешивали [6].

Для установления моносахаридного состава ВРПС, ПВ, ГЦ А и ГЦ Б проводили их гидролиз кислотой серной (1 моль/л) [9].

Моносахариды определяли в гидролизатах методом хроматографии на бумаге в системах растворителей: н-бутанол — пиридин — вода (6:4:3) и этилацетат — кислота уксусная — кислота муравьиная — вода (18:3:1:4) параллельно с достоверными образцами моносахаридов. Хроматограммы после высушивания на воздухе обрабатывали анилинфталатным реактивом и нагревали в сушильном шкафу при температуре (100-105) °С; моносахариды проявлялись в виде красновато-коричневых пятен.

Определение количественного содержания сахаров в гидролизатах выделенных ВРПС и ПВ проводили денситометрически

Таблица 1

**Характеристика веществ, выделенных из травы фиалки опушенной**

Вещество	Время удерживания (мин)	Количественное содержание (%)
изосалипурпозид	5.243	3.99
коричная кислота	5.655	2.23
феруловая кислота	6.024	3.38
арбутин	6.811	2.09
хлорогеновая кислота	7.618	3.67
дикумарин	8.076	3.41
кофейная кислота	9.034	6.92
эллаговая кислота	9.804	8.55
витексин	13.25	5.77
ориентин	15.66	24.57
кумарин	21.20	4.07
гиперозид	26.22	19.82
4-оксикумарин	34.60	0.12
виценин	39.95	0.30
кверцетин	70.27	0.01
катехин	72.26	0.02
лютеолин	85.23	0.01
апигенин	91.81	0.01

Таблица 2

## Характеристика полисахаридов, выделенных из травы фиалки опушенной

Полисахариды	Выход от воздушно-сухого сырья (%)	Содержание моносахаридов в полисахаридном комплексе (%)						
		Глюкоза	Галактоза	Ксилоза	Арабиноза	Рамноза	Галактуроновая кислота	Глюкуроновая кислота
ВРПС	10.0	7.32	28.35	0.36	24.61	1.98	3.86	1.29
ПВ	12.0	-	2.13	-	1.27	-	89.17	-
ГЦ А	4.3	+	+	+	+	+	-	-
ГЦ Б	3.5	+	+	+	+	+	-	-

## Примечания:

«+» — наличие моносахарида;

«-» — отсутствие моносахарида.

после хроматографии в тонком слое сорбента [11].

## Результаты и их обсуждение

В результате хроматографического анализа в наземной части фиалки опушенной обнаружено 5 веществ в виде пятен с голубой флуоресценцией, отнесенных к соединениям кумариновой природы, 7 веществ в виде пятен с голубой и голубовато-фиолетовой флуоресценцией в УФ-свете, отнесенных к фенолкарбоновым кислотам, 10 веществ в виде пятен с желтой флуоресценцией и темных пятен, отнесенных к флавоноидным соединениям.

В траве фиалки опушенной методом ВЭЖХ было установлено наличие 83 вещества фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами и фенолкарбоновыми кислотами. По времени удерживания стандартных растворов 18 веществ были идентифицированы как лютеолин, апигенин, кверцетин, катехин, изосалипурпозид, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, коричная кислота, дикумарин, 4-оксикумарин, кумарин, ориентин, виценин, гиперозид, эллаговая кислота, арбутин (Табл. 1). Методом внутренней нормализации определено, что среди кислот преобладают кофейная и эллаговая кислоты, среди флавоноидов — ориентин и гиперозид, из кумаринов — кумарин.

В траве фиалки опушенной лютеолин, апигенин, кверцетин, катехин, изосалипурпозид, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, коричная кислота, дикумарин, 4-оксикумарин, кумарин, ориентин, виценин, гиперозид, эллаговая кислота, арбутин идентифицированы впервые.

В результате проведенных исследований были выделены ВРПС, ПВ, ГЦ А, ГЦ Б. Выход

ВРПС составил 10.0 %, ПВ — 12.0 %, ГЦ А — 4.3 %, ГЦ Б — 3.5 % (Табл. 2).

ВРПС, выделенный из изучаемого растения, представляет собой аморфный порошок коричневого цвета; при растворении в воде образует опалесцирующий раствор (рН 1 % водного раствора находится в пределах 5-6); растворяется также в водных растворах кислот и щелочей и не растворяется в органических растворителях. Полисахаридный комплекс дает положительные реакции осаждения с 96 % спиртом, ацетоном, реакцию с реактивом Фелинга после кислотного расщепления полисахаридов [9].

ПВ, выделенный из исследуемого растения представляет собой аморфный порошок светло-серого цвета, хорошо растворимый в воде с образованием вязких растворов (рН 1 % водного раствора находится в пределах 3-4). Водный раствор пектиновых веществ осаждается 1 % раствором алюминия сульфата с образованием пектатов [7].

Методом хроматографии на бумаге параллельно с достоверными образцами сахаров в исследуемом ВРПС идентифицировали глюкозу, галактозу, арабинозу, рамнозу, ксилозу, глюкуроновую и галактуроновую кислоты. В выделенных ПВ преобладающей является галактуронозная кислота (89.17 %), кроме того, в них обнаружены и нейтральные моносахариды — галактоза, арабиноза (Табл. 2).

ГЦ А и ГЦ Б представляют собой аморфные порошки желтовато-коричневого цвета. В гидролизатах ГЦ А и ГЦ Б обнаружены ксилоза, рамноза, арабиноза, глюкоза и галактоза. По величине пятен и интенсивности их окраски определено, что преобладающим моносахаридом является ксилоза, что указывает на наличие полисахаридов типа ксиланов.

**Выводы**

1. Методами бумажной хроматографии, ТСХ и ВЭЖХ изучен компонентный состав фенольных соединений в траве фиалки опушенной *Viola hirta* L.

2. Методом ВЭЖХ обнаружено 83 вещества фенольной природы, которые в основном представлены флавоноидами, кумаринами и фенолкарбоновыми кислотами. Из них 18 веществ были идентифицированы как лютеолин, апигенин, кверцетин, катехин, изосалипурпозид, феруловая кислота, витексин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, коричная кислота, дикумарин, 4-оксикумарин, кумарин, ориентин, виценин, гиперозид, эллаговая кислота, арбутин. Все указанные соединения в траве фиалки опушенной обнаружены впервые.

3. Установлено, что в траве фиалки опушенной среди кислот преобладают кофейная и эллаговая кислоты, среди флавоноидов — ориентин и гиперозид, среди кумаринов — кумарин.

4. Впервые из травы фиалки опушенной выделены и исследованы полисахариды. Установлено, что углеводный комплекс данного растения представлен ВРПС, ПВ, ГЦ А и ГЦ Б; установлен их моносахаридный состав.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Бандюкова В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды // Химия природных соединений. - 1983. - № 3. - С. 263-273.
2. Бандюкова В.А., Шинкаренко А.А., Казаков А.А. Методы исследования природных флавоноидов. - Пятигорск, 1977. - 72 с.
3. Бубенчикова В.Н. Фармакогностическое изучение некоторых видов семейства Астровых и перспектива их практического использования: Автореф. ... дис. д-ра фармац. наук. - Пятигорск, 1993. - 40 с.
4. Камышев Н.С. Флора Центрального Черноземья и ее анализ. - Воронеж, 1978. - 116 с.
5. Королев В.А. Фармакогностическое изучение представителей рода Донник: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. - Пермь, 1996. - 26 с.
6. Кочетков Н.К. Химия биологически активных природных соединений. - М., 1970. - 378 с.
7. Лигай Л.В., Рахимов Д.А., Бандюкова В.А. Изучение углеводов *Malva neglecta* L. // Химия природных соединений. - 1989. - № 2. - С. 280-281.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Raeoniaceae* — *Thymelaeaceae*. - Л., 1985. - 336 с.

9. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов: Полисахариды. - М., 1978. - 256 с.
10. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хайца, К. Мацека. - М., 1962. - 851 с.
11. Филиппов М.П. Колориметрическое определение уронидной части в пектиновых веществах // Изв. АН МССР: Сер. биол. и хим. наук. - 1973. - № 3. - С. 76-79.
12. Briant E.T. // J. Amer. Pharm. Assoc. - 1950. - Vol. 39, No. 8. - P. 480-488.
13. Geissman T.A. Chemistry of flavonoid compounds. - Oxford, 1962.
14. Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А., Попова Н.В. Фиалка трехцветная и полевая: Химический состав и применение // Фармаком. - 2004. - № 1. - С. 62-66.

**Резюме**

Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.О.

**Фенольні сполуки та полісахариди *Viola hirta* L.**

У статті наведено результати дослідження фенольних сполук і полісахаридів надземної частини *Viola hirta* L. методами паперової хроматографії, тонкошарової хроматографії та ВЕРХ. Зазначеними методами виявлено 83 речовини фенольної природи, що переважно представлені флавоноїдами, кумаринами, фенолкарбоновими кислотами. Фенольні сполуки у даній рослині ідентифіковано вперше. Встановлено, що вуглеводневий комплекс надземної частини *Viola hirta* L. представлено водорозчинними полісахаридами, пектиновими речовинами, геміцелюлозами; встановлено їх моносахаридний склад. Полісахариди трави *Viola hirta* L. виділено та досліджено вперше.

**Summary**

Litvinenko V.I., Bubenchikov R.A.

**Phenol compounds and polysaccharides of *Viola hirta* L.**

In the article the results of *Viola hirta* L. above-ground part phenol compounds and polysaccharides study using the methods of paper chromatography, thin-layer chromatography and HPLC are given. By these methods, 83 phenol substances that are represented substantially by flavonoids, coumarins, phenol carboxylic acids were detected. It was established that *Viola hirta* L. above-ground part carbohydrate complex is represented by the water-soluble polysaccharides, pectic compounds, hemicelluloses, and their monosaccharide composition was established. Polysaccharides of *Viola hirta* L. herb were isolated and studied for the first time.

**Литвиненко Василій Іванович** (р. 1932). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Д.х.н. (1990). Профессор (1991). Академик ИА Украины (2000). Зав. сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

**Бубенчиков Роман Александрович** (р. 1976). Окончил Курский государственный медицинский университет (2000). К.мед.н. (2002). Врач Курского областного кожно-венерологического диспансера.

УДК 547.587.51:577.152.311:542.978:542.947:582.736:582.893.6

Янченко П.С., Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М.  
Національний фармацевтичний університет  
Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

## Виділення та вивчення фурукумаринів деяких рослин родини Селерові та їх ліпазотропна активність

Із рослин родини Аріасеае (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.) виділено та встановлено структуру 16 фурукумаринів. Вперше вивчено ліпазотропну активність 9 фурукумаринів. Встановлено, що 7 речовин в умовах експерименту мають статистично достовірний вплив на ліпазу (активуючий для дигідрофуранокумарину, ксантотоксолу, імператорину, пеуцеданіну, дигідроангеліцину та інгібуючий для псоралену та ксантотоксину). Найбільш перспективним для подальшого дослідження визначений інгібітор ксантотоксин.

Пошук речовин із ліпазотропною активністю, тобто здатних впливати на активність ліпази, є актуальною задачею сучасної фармації. Ліпазотропні агенти є перспективними з точки зору створення ефективних препаратів для терапії ожиріння, атеросклерозу, гіпертригліцеридемій, ліпаземічних станів (інгібітори), абсолютної або відносної ензимної недостатності шлунково-кишкового тракту, диспепсичних розладів (активатори у складі ферментних препаратів) тощо.

Одним із перспективних джерел ліпазотропних агентів є рослини, зокрема рослинні біологічно активні речовини. На даний час роботи з пошуку рослинних інгібіторів ліпази у світової науці набувають широкого розвитку. Зокрема, показана перспективність пошуку інгібіторів ліпаз серед фенольних сполук [1, 2], сапонінів [3, 4], кумаринів [5].

Метою даної роботи є виділення, ідентифікація та визначення ліпазотропної активності деяких похідних лінійного фурукумарину (фууро-2',3':6,7-кумарину, псоралену) та ангулярного кумарину (фууро-2',3':7,8-кумарину, ангеліцину) із рослин родини Селерові — *Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L. та *Daucus carota* L. (Раніше повідомлялося про ліпазотропну активність екстрактів із зазначених вище рослин [6]).

### Матеріали та методи

Сировиною для виділення індивідуальних речовин була трава рослин *Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L. (Аріасеае), що зібрана в липні 2003 року в Харківському та Дергачівському районах Харківської області.

Виділення суми фурукумаринів із сировини проводили екстракцією спирто-водними сумішами (*Angelica archangelica* L. — 90 % спирт, *Heracleum sphondylium* L. та *Daucus carota* L. — 80 % спирт) із подальшим упарюванням до смолистого (*Angelica archange-*

*lica* L.) або водного (*Heracleum sphondylium* L. та *Daucus carota* L.) залишку та фракціонуванням витягу неполярними розчинниками (бензолом (сума фурукумаринів *Angelica archangelica* L., хлороформом (сума кумаринів *Heracleum sphondylium* L. та *Daucus carota* L.)). Одержані суми кумаринів розділяли за допомогою хроматографії на колонках, заповнених кислим оксидом алюмінію, контроль за хроматографуванням проводили в УФ-світлі, за допомогою хроматографії на папері або тонкошарової хроматографії. Деякі суми речовин, що не вдалося розділити на зазначених колонках, були розділені на колонках, заповнених силікагелем із 5 % гіпсу [7, 8].

Ідентифікацію виділених речовин проводили після підтвердження їх кумаринової структури реакцією з кислотою йодистоводневою у середовищі рідкого фенолу з оцтовим ангідридом [9]. У попередніх дослідженнях вивчено хроматографічну поведінку, характер флуоресценції та проведено кольорові реакції [10, 11]. Для подальшої ідентифікації речовин проводили порівняння їх фізико-хімічних властивостей із властивостями достовірних зразків. Температуру плавлення визначали за допомогою приладу «Buchі Melting Point B-545» (Швейцарія), ІЧ-спектри знімали на приладі «Nicolet Avatar 320 IR» (США), УФ-спектри одержували на спектрофотометрі «Hewlett Packard HP 8452». Елементний аналіз проведено на автоматичному аналізаторі «С-Н-Н Hewlett Packard M-185» (США).

Визначення ліпазотропної активності проводили за допомогою методу рН-статкування у модифікації, розробленій нами для рослинних БАР [12, 13]. Суть даного методу полягає у підтримці певного значення рН протягом ліполітичної реакції за допомогою титранту — розчину луку (використовували титровані розчини натрію гідроксиду з концентра-

Таблиця

Характеристика фізико-хімічних властивостей виділених речовин

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т. пл. (°С)	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
<b>Похідні псоралену</b>					
псорален (фууро-2',3':6,7-кумарин)	трава <i>H. sphondylium</i>	$C_{11}H_6O_3$	161 – 163	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 240 нм, 248 нм, 288 нм та 330 нм); - ІЧ-спектр ( $1730\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1610\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $1080\text{ см}^{-1}$ (бензофуранове угруповання), $860\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком псоралену.
бергаптен (5-метокси-псорален)	трава <i>H. sphondylium</i> , <i>A. archangelica</i> , <i>D. carota</i>	$C_{12}H_8O_4$	188 – 190	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 248 нм та 310 нм); - ІЧ-спектр ( $1720\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1620\text{ см}^{-1}$ та $1608\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $1084\text{ см}^{-1}$ (бензофуранове угруповання), $865\text{ см}^{-1}$ , $834\text{ см}^{-1}$ та $820\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком бергаптену.
ізоімператорин (5-ізопентеніл-оксипсорален)	трава <i>A. archangelica</i>	$C_{16}H_{14}O_4$	108 – 109	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 221 нм, 250 нм, 307 нм); - дані гідролізу кислотою сірчаною (бергаптол); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком ізоімператорину.
оксипеуцеданін (5-(2,3-епоксі-ізопентеніл-оксипсорален)	трава <i>A. archangelica</i>	$C_{16}H_{14}O_5$	141 – 143	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 220 нм, 249 нм, 266 нм, 306 нм); - ІЧ-спектр ( $1730\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1620\text{ см}^{-1}$ та $1580\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $1256\text{ см}^{-1}$ (епоксигрупа) та $1074\text{ см}^{-1}$ (бензофуранове угруповання); - дані гідролізу кислотою хлористоводневою в метанолі (бергаптол); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком оксипеуцеданіну.
ксантотоксол (8-гідроксипсорален)	трава <i>A. archangelica</i>	$C_{11}H_6O_4$	249 – 252	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 218 нм, 250 нм, 262 нм, 268 нм, 307 нм, при додаванні етилату натрію – батохромний зсув (224 нм, 264 нм, 315 нм); - результати метилювання диметилсульфоксидом (ідентифіковано ксантотоксин).



Таблиця (продовження)

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т. пл. (°С)	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
ізоімпінілін (5,8-диметокси-псорален)	трава <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i>	$C_{13}H_{10}O_5$	146 - 148	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ 223 нм, 242 нм, 250 нм, 270 нм, 313 нм); - ІЧ-спектр ( $1720\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1603\text{ см}^{-1}$ та $1550\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $867\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком ізоімпініліну.
імператорин (5-ізопентеніл-оксипсорален)	трава <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i>	$C_{16}H_{14}O_4$	99 – 101	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ 248 нм та 300 нм); - ІЧ-спектр ( $1722\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1624\text{ см}^{-1}$ та $1586\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $1082\text{ см}^{-1}$ (бензофуранове угруповання) та $882\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок), $1670\text{ см}^{-1}$ , $1434\text{ см}^{-1}$ та $1382\text{ см}^{-1}$ (ізопентенільний радикал)); - дані кислотного гідролізу кислотою сірчаною (ксантотоксол); - дані окиснення хромовим ангідридом (ацетон).
фелоптерин (5-метокси-8-ізопентеніл-оксипсорален)	трава <i>H. sphondylium</i>	$C_{17}H_{16}O_5$	100 – 102	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ 270 нм та 319 нм); - ІЧ-спектр ( $1722\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1603\text{ см}^{-1}$ та $1590\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $1067\text{ см}^{-1}$ (бензофуранове угруповання) та $890\text{ см}^{-1}$ , $869\text{ см}^{-1}$ , $838\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок)); - дані гідролізу кислотою сірчаною (5-метокси-8-гідроксипсорален); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком фелоптерину.
біангеліцин (5-метокси-8-ізопентеніл-оксипсорален)	трава <i>H. sphondylium</i>	$C_{17}H_{18}O_7$	117 – 118	$[\alpha]_D^{21} = +24.0^\circ$ (піридин)	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ 222 нм, 247 нм, 274 нм та 314 нм); - ІЧ-спектр ( $3370\text{ см}^{-1}$ (гідроксигрупа), $2985\text{ см}^{-1}$ та $2930\text{ см}^{-1}$ (оксиметильна група), $1733\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1630\text{ см}^{-1}$ та $1557\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце)); - дані гідролізу кислотою хлористоводневою в метанолі (5-метокси-8-гідроксипсорален); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком біангеліцину.

Таблиця (продовження)

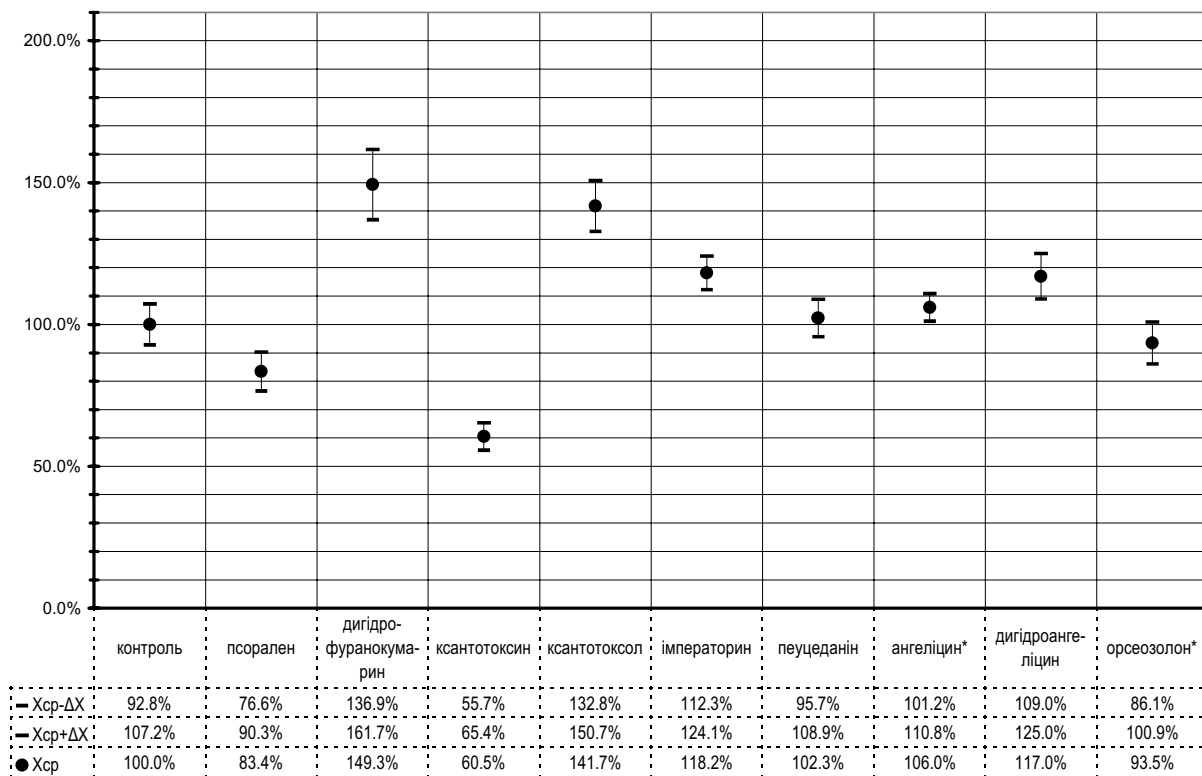
Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т. пл. (°С)	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
пеucedанін (4'-метокси-5'-ізопропілпсорален)	трава <i>D. carota</i>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	99 – 101	-	- дані елементного складу; - при паралельному хроматографуванні з достовірним зразком пеucedаніну методом ТШХ на пластинках силікагелю у системі петролейний ефір – діетиловий ефір (1:2) – основна пляма з R <sub>f</sub> 0.49, (жовта флуоресценція) – ідентична плямі достовірного зразка; - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком пеucedаніну.
<b>Похідні ангеліцину</b>					
ангеліцин (фууро-2',3':7,8-кумарин)	трава <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i>	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	139 - 141	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр (λ <sub>max</sub> 245 нм и 290 нм); - ІЧ-спектр (1744 см <sup>-1</sup> (оксогрупа α-пірону), 1612 см <sup>-1</sup> та 1542 см <sup>-1</sup> (ароматичне кільце), 828 см <sup>-1</sup> та 865 см <sup>-1</sup> (непланарний подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком ангеліцину.
сфондін (6-метоксіангеліцин)	трава <i>H. sphondylium</i>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	190 - 192	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр (λ <sub>max</sub> 248 нм, 295 нм, 345 нм); - ІЧ-спектр (1715 см <sup>-1</sup> (оксогрупа α-пірону), 1625 см <sup>-1</sup> та 1581 см <sup>-1</sup> (ароматичне кільце), 882 см <sup>-1</sup> та 864 см <sup>-1</sup> (непланарний подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком сфондіну.
ізобергаптен (5-метоксіангеліцин)	трава <i>H. sphondylium</i>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	218 – 222	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр (λ <sub>max</sub> 222 нм, 250 нм, 268 нм та 360 нм); - ІЧ-спектр (1740 см <sup>-1</sup> (оксогрупа α-пірону), 1635 см <sup>-1</sup> та 1610 см <sup>-1</sup> (ароматичне кільце), 845 см <sup>-1</sup> (подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком ізобергаптену; - хроматографування паралельно з достовірним зразком ізобергаптену дає однакове значення R <sub>f</sub> (ТШХ на пластинках силікагелю в системах петролейний ефір – діетиловий ефір (1:1) та петролейний ефір – етилацетат (2:1) – плями з R <sub>f</sub> 0.20 та 0.70, (блакитна флуоресценція) ідентичні плямам достовірного зразка.



Таблиця (продовження)

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т. пл. (°C)	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
пімпінелін (5,6-диметокси-ангеліцин)	трава <i>A. archangelica</i> <i>H. sphondylium</i>	$C_{13}H_{10}O_5$	117 – 119	-	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 221 нм, 253 нм, 305 нм); - ІЧ-спектр ( $1725\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1625\text{ см}^{-1}$ та $1578\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце), $879\text{ см}^{-1}$ та $860\text{ см}^{-1}$ (подвійний зв'язок)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком пімпінеліну.
гераклесол (5-метокси-6-(2,3(R)-дигідрокси-3-метилбутил-окси) ангеліцин)	трава <i>H. sphondylium</i>	$C_{17}H_{18}O_7$	117 – 119	+30° (метанол)	- дані елементного складу; - УФ-спектр ( $\lambda_{max}$ 223 нм, 254 нм, 306 нм); - ІЧ-спектр ( $3525\text{ см}^{-1}$ та $3400\text{ см}^{-1}$ (гідроксигрупа), $1715\text{ см}^{-1}$ (оксогрупа $\alpha$ -пірону), $1624\text{ см}^{-1}$ та $1577\text{ см}^{-1}$ (ароматичне кільце)); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком гераклесолу.

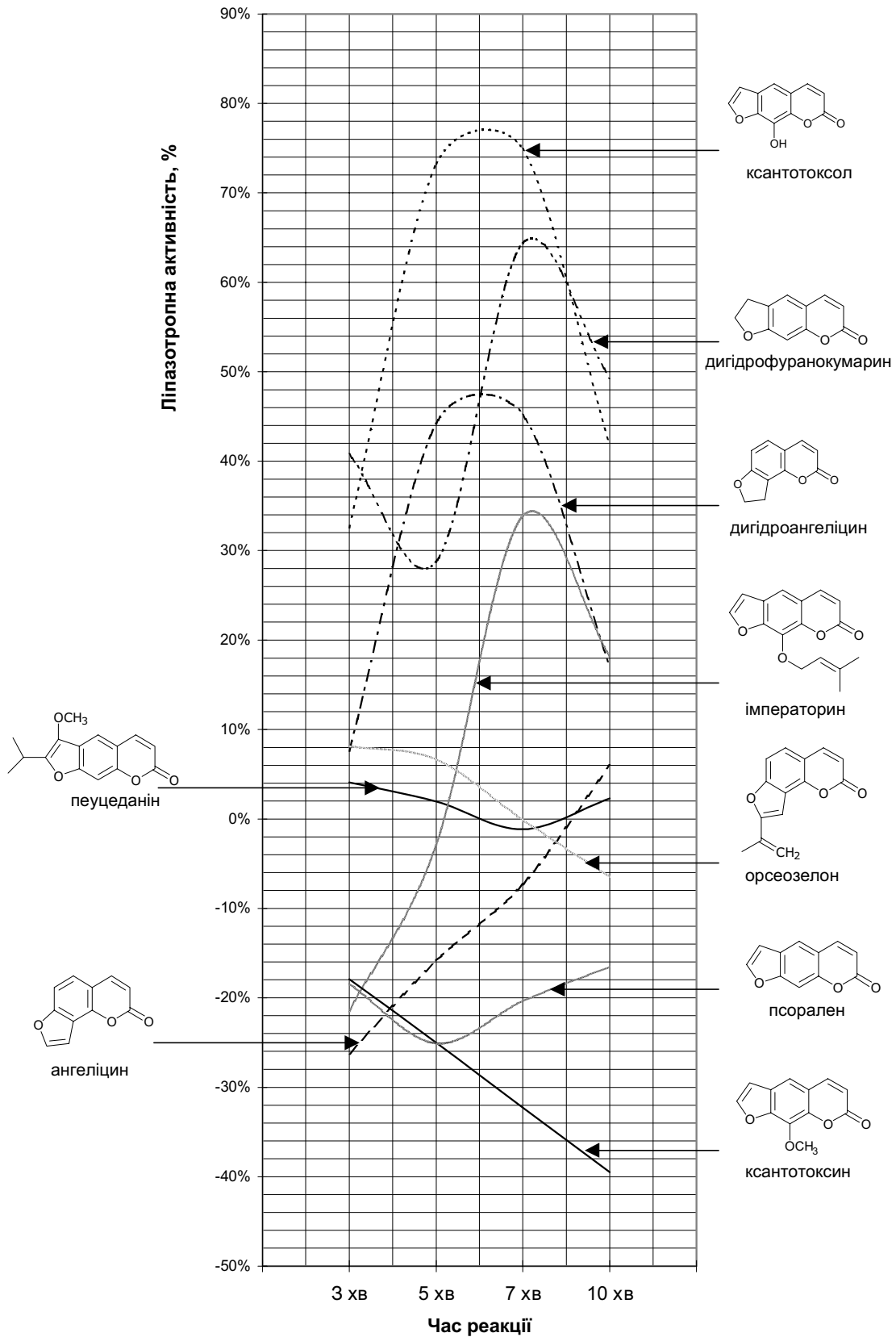
Рисунок 1



Відносна активність ліпази в досліді з виділеними речовинами



Рисунок 2



Динаміка розвитку ліпазотропної активності виділених речовин

цією 0.033 М та 0.1 М). Активність ліпази пропорційна швидкості витрати титранту. Ліпазотропну активність речовини встановлювали визначенням достовірної різниці між швидкістю витрати титранту в досліді з випробовуваною речовиною та контрольному досліді. Використовували методи статистичної обробки та інтерпретації результатів, що описані в [14].

Для проведення екстракції, хроматографування, кристалізації та ін. використовували розчинники та реактиви марки х.ч. та ч.д.а.

Як модельний фермент використовували панкреатин (Pancreatin from hog pancreas, «Fluka», кат. № 76190, номінальна активність не менше 8 ЛО/мг, паспортна активність препарату 27 ЛО/мг), який вводили у концентрації  $5.1 \times 10^{-4}$  г/мл. Як субстрат використовували оливкову олію фармакопейної якості. Речовини вводили у концентрації  $1 \times 10^{-4}$  г/мл.

Зразки дигідрофуранокумарину, дигідроангеліцину, пеуцеданіну та орсеозелону, які були використані для визначення ліпазотропної активності, предоставлені д.фарм.н., професором Комісаренко Н.Ф.

#### Обговорення результатів досліджень із виділення індивідуальних речовин

Використання методів багаторазової екстракції та розділювальної хроматографії на колонках із подальшою перекристалізацією речовин дозволило виділити із наведеної сировини похідні псоралену та ангеліцину, наведені в Таблиці.

Таким чином, із трави зазначених рослин було виділено та ідентифіковано 11 речовин, що є похідними лінійного фурукумарину (фууро-2',3':6,7-кумарину) та 5 речовин - похідних ангулярного фурукумарину (фууро-2',3':7,8-кумарину). При цьому одержано 5 речовин у кількості, достатній для визначення їх ліпазотропної активності.

#### Обговорення результатів із визначення ліпазотропної активності виділених речовин

Нами була визначена ліпазотропна активність 9 речовин фурукумаринової природи. 7 речовин в умовах експерименту виявляли статистично значущий вплив на активність ліпази. Дані про середню відносну активність панкреатичної ліпази за 10 хвилин у досліді із випробовуваними речовинами та контрольному досліді предсталені на Рис. 1.

Визначено, що інгібуючі властивості мають дві речовини псораленового ряду — псо-

рален та ксантотоксин, останній є більш потужним інгібітором (різниця достовірна при  $n_{A1} = 3$ ,  $n_{A2} = 3$ ,  $p = 0.05$ ). Інші речовини мали помірні активуючі властивості (достовірно відносно контролю при  $n_k = 76$ ,  $n_A = 3$ ,  $p = 0.05$ ). Встановлено, що ефекти впливу ангеліцину (активуючий) та орсеозелону (інгібуючий) недостовірні за аналогічних параметрів статистичної обробки. Також слід відзначити дуже несуттєвий активуючий вплив пеуцеданіну (+ 2.3 %, різниця достовірна відносно контролю при  $n_k = 76$ ,  $n_A = 3$ ,  $p = 0.05$ ).

Здійснено також дослідження динаміки розвитку ліпазотропного ефекту. Криві розвитку ліпазотропного ефекту представлені на Рис. 2. Для більшості речовин спостерігалось наростання ліпазотропного ефекту до 5–7 хв та згасання при подальшому проходженні реакції ліполізу. Ця закономірність не спостерігалась тільки для ксантотоксину, інгібуючий ефект якого послідовно зростав протягом реакції. Таким чином, ми вважаємо ксантотоксин перспективним інгібітором ліполізу, що потребує подальшого дослідження.

#### Висновки

1. Із рослин родини Селерові (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.) виділено та встановлено структуру 16 речовин, що є похідними псоралену та ангеліцину.

2. Вперше досліджено ліпазотропну активність 9 фурукумаринів, встановлено ліпазотропну активність 7 речовин (активуючу для дигідрофуранокумарину, ксантотоксолу, імператорину, пеуцеданіну, дигідроангеліцину та інгібуючу для псоралену та ксантотоксину). Найбільш перспективним для подальшого дослідження визначено ксантотоксин (інгібітор).

#### ЛІТЕРАТУРА

1. 5-Hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: A pancreatic lipase inhibitor isolated from *Alpinia officinarum* // *Biol. Pharm. Bull.* — 2004. — Vol. 27, No. 1. — P. 138 — 140.
2. Ковальова А.М. Визначення ліпотропної активності поліфенольних сполук рослинного походження // *Вісник фармації.* — 1999. — № 1. — С. 25 — 28.
3. Chu S, Qu W, Pang X et al. [Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia] [Article in Chinese] // *Zhong Yao Cai.* — 2003. — Vol. 26, No. 5. — P. 341 — 344.
4. Han LK, Kimura Y, Kawashima M. et al. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor // *Int J Obes Relat Metab Disord.* — 2001. — Vol 25, No. 10 — P. 1459 — 1464.
5. Янченко П.С., Комісаренко А.М. Ліпазотропна активність деяких біологічно активних сполук рослин ро-

дин Бобови та Селерові // Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія: Тези доповідей III Міжнар. наук. – практ. конф. - Ч. 1 – Х.: Вид-во НФАУ, 2003. – С. 364.

6. Янченко П.С., Ковальова А.М., Комісаренко А.М. Ліпазотропна активність екстрактів із рослин деяких видів родин Бобові та Селерові // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. ст. – Т. 3 – Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2004. – С. 308 - 314.

7. Гиоргобиани Э.Д., Комиссаренко Н.Ф., Кемертелидзе Э.И. Исследование кумаринов рода Борщевика флоры Грузии // Сообщ. АН ГССР. – 1969. – Т. 53, № 2. – С. 265 – 268.

8. Комиссаренко Н.Ф., Зоз И.Г. Химическое исследование *Coronilla varia* L. и некоторых близких видов // Растительные ресурсы. – 1969. – Т. 5. - Вып. 2. – С. 178 – 181.

9. Дрозд Г.А., Комиссаренко Н.Ф. Качественное обнаружение кумаринов в растительном сырье // IV Всесоюз. симпозиум по фенольным соединениям: Тез. докл. – Ташкент, 1982. – С. 27 – 28.

10. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1990. – 333 с.

11. Георгиевский В.П. Применение хроматографии в тонких слоях сорбента для идентификации и количественного определения биологически активных веществ растительного происхождения. – М.: ЦБНТИ-медпром, 1975. – 64 с.

12. Янченко П.С., Комісаренко А.Н., Георгієвський Г.В. Метод визначення ліпазотропної активності речовин // Фармаком. – 2001. - № 3. – С. 44 – 47.

13. Янченко П.С., Пашнев П.П., Казаринов Н.А., Комиссаренко А.Н. Исследование липазотропной активности силибора // Фармаком. – 2003. – № 1. – С. 75 – 77.

14. Проект общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистический анализ результатов химического эксперимента» // Фармаком. – 2002. - № 1. – С. 15 - 48.

#### Резюме

Янченко П.С., Ковалева А.М.,  
Георгиевский Г.В., Комиссаренко А.Н.

#### Выделение и изучение фурукумаринов некоторых растений семейства Селеровые и их липазотропная активность

Из растений семейства Apiaceae (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota*

L.) выделены 16 фурукумаринов и установлена их структура. Впервые изучена липазотропная активность 9 фурукумаринов. Установлено, что в условиях эксперимента 7 веществ имеют статистически достоверное влияние на липазу (активирующее для дигидрофуранокумарина, ксантолола, императорина, пецеданина, дигидроангелицина и ингибирующее для псоралена и ксантотоксина). Наиболее перспективным для дальнейшего исследования является ингибитор ксантотоксин.

#### Summary

Yanchenko P.S., Kovaliova A.M.,  
Georgievskiy G.V., Komissarenko A.N.

#### Isolation and study of furocoumarines from some celeriac plants and their lipasetropic activity

Sixteen furocoumarinic substances were isolated from Apiaceae plants (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.) and the structure of these substances was established. The lipasetropic activity of nine furocoumarinic substances was studied for the first time. It was established that under the experiment conditions seven substances have statistically reliable impact on lipase (activating for dihydrofurane coumarin, xanthotoxol, pectedanin, dihydroangelacin, and inhibiting for psoralen and xanthotoxin). Inhibitor xanthotoxin was considered to be the most perspective for the further study.

**Янченко Павло Сергійович** (н. 1978). Закінчив Національну фармацевтичну академію України (2000). Аспірант кафедри фармакогнозії НФАУ.

**Ковальова Алла Михайлівна**. Закінчила Харківський фармацевтичний інститут. Д.фарм.н. Професор кафедри фармакогнозії НФАУ.

**Георгієвський Геннадій Вікторович** (н. 1969). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1992). К.фарм.н. (1995). Ст. наук. співр. відділу Державної Фармакопеї України ДП "Науково-експертний фармакопейний центр". Зав. лабораторії фізико-хімічних процесів ДП ДНЦЛЗ (2001).

**Комісаренко Андрій Миколайович** (н. 1962). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1984). Д.фарм.н. (2000). Професор кафедри «Хімія природних сполук» НФАУ.

## Фармакологічні дослідження

УДК: 547.98: 57.017.67

Яковлева Л.В., Карбушева І.В., Лар'яновська Ю.Б.  
Національний фармацевтичний університет

### Вивчення впливу елгацину на морфоструктуру міокарда здорових щурів різного віку

Наведено результати експериментального дослідження впливу препарату «Елгацин», одержаного із суплідь вільхи сірої (*Alnus cinerea* L.) і вільхи клейкої (*Alnus glutinosa* L.), на вікові зміни морфоструктури тканин міокарда здорових щурів. Встановлено, що статеве дозрівання інтактних щурів на морфоструктурному рівні супроводжується незначним збільшенням об'єму ядер кардіоміоцитів та їх поліморфізму. У старих тварин спостерігали стоншення м'язових волокон, а також розвиток кардіосклерозу. Профілактичне введення елгацину в дозі 1 мг/кг сприяло усуненню мікроциркуляторних порушень та кардіосклерозу у старих тварин. Одержані результати свідчать про перспективність застосування елгацину у геріатричній практиці з метою профілактики вікових змін серцево-судинної системи.

Прискорення темпів старіння населення, ріст числа «вікових захворювань» та їх значне омолодження обумовлюють актуальність дослідження механізмів старіння з метою створення геропротекторних засобів.

Одним із напрямків дослідження механізмів процесу старіння та оцінки можливостей його фармакокорекції є вивчення морфоструктурних змін у тканинах та органах, зокрема у серцевому м'язі. Серцево-судинна система однією з перших реагує на старіння організму гуморальними, функціональними, клінічними та морфологічними змінами, які проявляються розвитком так званих «вікових захворювань» (гіпертонічна хвороба, атеросклероз та його ускладнення – інфаркти та інсульти), що, у свою чергу, є основною причиною смертності у похилому віці [7]. Так, за даними американських демографів, ішемічна хвороба серця у пацієнтів старших за 75 років складає 70 % серед усіх захворювань, та у 2/3 випадках є причиною смерті [1, 7]. У зв'язку з цим важливим напрямком геропротекції є пошук засобів профілактики зазначених вікових захворювань.

Об'єктом наших досліджень став новий препарат «Елгацин», розроблений вченими НФаУ разом зі співробітниками ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» на основі елагової кислоти, що за хімічною структурою є представником гідролізованих дубильних речовин. У доклінічних дослідженнях, проведених на базі Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ, встановлені антиоксидантні, мембранопротекторні, антиексудативні властивості елгацину, що обумовили виражену кардіопротекторну дію у тварин репродуктивного віку, а також були передумовою для дослідження впливу препарату на міокард тварин різного віку [8].

У раніше проведених дослідженнях було встановлено, що найбільш інтенсивно процеси переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) протікають у статевонезрілих тварин. Процес статевого дозрівання інтактних тварин характеризувався активацією ендогенної антиоксидантної системи (АОС) та функціональної діяльності міокарда. При старінні інтактних тварин відбувалося зниження антиоксидантного захисту кардіоміоцитів на тлі збереження активності ПОЛ на рівні статевозрілих тварин [9]. Елгацин при профілактичному введенні у дозі 1 мг/кг відновлював порушену з віком рівновагу ПОЛ/АОС у інтактних тварин 24-місячного віку. Одержані результати свідчать про потенційні геропротекторні властивості елгацину та доцільність проведення подальших досліджень у цьому напрямку [10].

Метою даної роботи стало дослідження впливу елгацину на морфоструктуру міокарда здорових щурів різного віку.

#### Матеріали та методи

В експерименті використовували білих безпородних щурів-самців різного віку. Вибір вікових періодів тварин для дослідження проводили у відповідності з метою дослідження та з урахуванням співвідношення віку тварин із віком людини [2, 16]:

- інфантильний (0.5-1 міс) — 4-7 років;
- пубертатний (2.5-4 міс) — 14-17 років;
- репродуктивний (5-7 міс) — 20-24 років;
- зрілий ранній (10-15 міс) — 31-43 роки;
- зрілий пізній (16-20 міс) — 45-55 років;

— старечий (21-26 міс) — 56 і більше років.

Згідно з наведеними даними у досліді використовували щурів таких вікових груп: інфантильні (1.5 міс), пубертатного періоду (3 міс), репродуктивного віку (6 міс), зрілого раннього віку (12 міс) і старечого віку (24 міс).

Усього було поставлено 10 серій дослідів на 100 білих щурах. Кожна вікова група включала 2 підгрупи по 10 тварин: 1 — інтактні тварини; 2 — тварини, які протягом 1-го місяця одержували елгацин у дозі 1 мг/кг. Доза елгацину встановлена у доклінічних дослідженнях як найбільш ефективна за кардіопротекторною дією [8]. Елгацин вводили внутрішньощлунково щоденно у вигляді водної суспензії з твіном 80 натще.

Морфологічну структуру серцевого м'яза досліджували методом світлової мікроскопії після стандартної обробки тканин серця на забарвлених гематоксиліном та еозином зрізах [3]. Під час розтину тварин визначали

абсолютну масу серця, вираховували серцевий індекс (СІ) — відношення маси серця до маси тіла. Усі одержані результати обробляли за спеціальною програмою «Statistica 5.0 for Windows». Статистична обробка результатів проведених досліджень здійснена за допомогою коефіцієнта (t) Стьюдента [4].

*Результати та їх обговорення*

При розтині міокард щурів інфантильного, пубертатного, репродуктивного та зрілого віку був у стані тонічного скорочення. У частини старих щурів серце було в'ялим, а порожнини його розширені. СІ складав: у інфантильних тварин  $0.59 \pm 0.03$ , у тварин пубертатного і репродуктивного віку —  $0.75 \pm 0.04$  і  $0.82 \pm 0.03$ , відповідно, у тварин зрілого раннього віку і старих —  $0.39 \pm 0.01$  і  $0.36 \pm 0.03$ , відповідно (Таблиця). Таким чином, одержані результати та їх аналіз показав, що в онтогенезі щурів інфантильного,

Таблиця

**Вплив елгацину на показник серцевого індексу здорових щурів різного віку (n=10)**

Група тварин	Серцевий індекс, %				
	тварини віком 1 міс	тварини віком 3 міс	тварини віком 6 міс	тварини віком 12 міс	тварини віком 24 міс
інтактний контроль	$0.59 \pm 0.03$	$0.75 \pm 0.04^{*1}$	$0.82 \pm 0.06^{*1}$	$0.39 \pm 0.01^{*1*3*6}$	$0.36 \pm 0.03^{*1*3*6}$
тварини, які одержували елгацин (1 мг/кг)	$0.56 \pm 0.02$	$0.90 \pm 0.09$	$0.93 \pm 0.08$	$0.39 \pm 0.01$	$0.37 \pm 0.04$

Примітки:

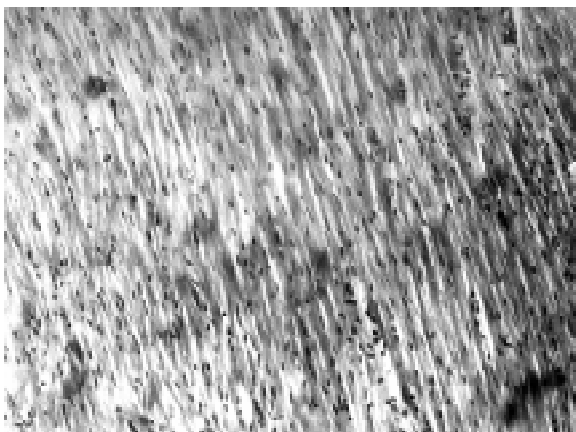
\*1 — відхилення вірогідне по відношенню до 1 місячних тварин ( $p \leq 0.05$ );

\*3 — відхилення вірогідне по відношенню до 3 місячних тварин ( $p \leq 0.05$ );

\*6 — відхилення вірогідне по відношенню до 6 місячних тварин ( $p \leq 0.05$ );

n — кількість тварин у групі.

Рисунок 1



**Серцевий м'яз щура інфантильного віку (1 міс) інтактної групи**

Добре розвинена структура, м'язові волокна звичайного вигляду, нормальні ядра кардіоміоцитів. Гематоксилін та еозин,  $\times 160$ .

пубертатного і репродуктивного віку відбувалося прогресивне збільшення серцевого індексу, що, можливо, пов'язано з тим, що збільшення серцевого м'яза у цей період випереджає ріст інших органів і систем та приріст загальної маси тіла [5]. З іншого боку, збільшення СІ корелює з одержаними у попередніх дослідках біохімічними та функціональними змінами міокарда, пов'язаними з активацією серцево-судинної системи щурів у пубертатному періоді розвитку [10]. Не зважаючи на те, що до 6-ти місячного віку відбувалася стабілізація біохімічних та функціональних показників, серцевий індекс, як найбільш стабільний показник, залишався на рівні серцевого індексу пубертатних тварин (Таблиця). У зрілих та старих тварин серцевий індекс достовірно знижувався у порівнянні з іншими віковими групами, що

можна пояснити припиненням росту серця при прирості маси тіла, що продовжується у цьому віці.

Мікроскопічне дослідження серцевого м'яза показало, що у інтактних щурів інфантильного періоду життя він мав досить виражену синтиціальну структуру з м'язовими волокнами звичайного вигляду, нормальним співвідношенням м'язової та сполучної тканин (Рис. 1). Ядра кардіоміоцитів були дещо зменшені. У щурів пубертатного віку відмічали незначне збільшення об'єму ядер кардіоміоцитів та їх чисельності на визначеній ділянці волокон, що відповідає фізіологічним змінам, які відбуваються у цей віковий період (Рис. 2А). У тварин репродуктивного віку спостерігали дуже помірний поліморфізм ядер кардіоміоцитів, появу дрібних зон міомаляції волокон, зтертості поперечної посмугованості міофібрил. У щурів зрілого віку помітнішим стає поліморфізм ядер кардіоміоцитів, з'являються нечисельні гіпертрофовані волокна (Рис. 3А). У серцевому м'язі старих тварин були видимі ділянки гіпертрофії м'язових волокон, що чергувалися з полями нормальних і (рідше) стоншених волокон (Рис. 4А). Збільшувалася кількість дрібних зон міолізу м'язових волокон, затушованості поперечної посмугованості міофібрил. З'явилися вакуолізовані кардіоміоцити. М'язові волокна стоншеного вигляду були більш інтенсивно забарвлені еозином, збільшувався міжм'язовий простір. Виразно простежувалося розширення дрібних вен і венул, досить часто зустрічалися діapedезні крововиливи (Рис. 4А). У дрібних артеріях була дещо стоншеною середня оболонка. У багатьох тварин виявлялися різні за розміром зони склерозу (Рис. 4Б). Слід відмітити, що зміни в міокарді старих тварин носили нерівномірний характер і, можливо, мали відношення до найбільш функціонально активних відділів.

Таким чином, аналіз морфоструктури міокарда інтактних тварин різного віку показав, що морфологічно у серцевому м'язі інфантильних, пубертатних та тварин репродуктивного віку виражених змін не відбувалося, за виключенням незначного збільшення об'єму та чисельності ядер у пубертатних щурів, що не можна розглядати як патологію, оскільки воно є компенсаторно-приспосувальною реакцією на фізіологічні перебудови, характерні для цього віку, коли відбувається активне дозрівання репродуктивної та інших систем і органів, а також перебудова систем регуляції: ендокринної, нервової та ін. У зрілих

та старих тварин (у значно більшій мірі) спостерігалася деяка перебудова міокарда: розвивалася гіпертрофія, дистрофія, з'являлися зони стоншення волокон, збільшення міжм'язового простору.

Є дані, що зазначені морфологічні вікові зміни у людей похилого віку супроводжуються зниженням внутрішньоклітинного тиску [5, 6]. Це призводить до порушення крово- і лімфообігу в міокарді, що, у свою чергу, є причиною міомаляції, а у подальшому – розвитку вікового кардіосклерозу [6].

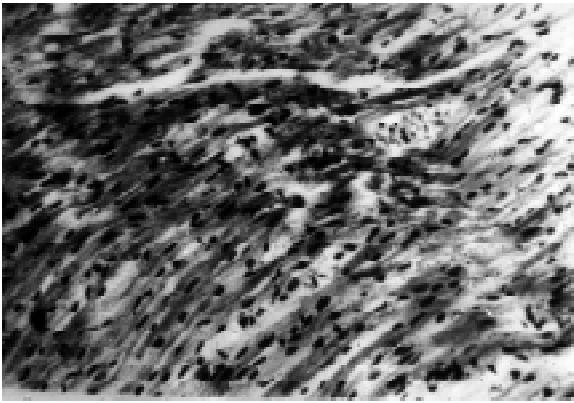
У тварин усіх вікових груп, що одержували елгацин у дозі 1 мг/кг протягом 1 міс, при розтині не відмічено дряблості серцевого м'яза та його видимих змін. Відмічена така сама закономірність у змінах СІ, що і у інтактних тварин різних вікових груп (Таблиця). У порівнянні з інтактними щурами аналогічного віку, у щурів пубертатного та репродуктивного віку виявлена тенденція до збільшення СІ.

Мікроскопічні дослідження показали, що елгацин не впливав на морфоструктуру серцевого м'яза щурів інфантильного і репродуктивного віку у порівнянні з інтактним контролем. У пубертатних тварин препарат сприяв нормалізації чисельності та розмірів ядер у порівнянні з інтактним контролем. Таким чином, застосування елгацину сприяє підвищенню адаптаційних можливостей серцево-судинної системи пубертатних щурів завдяки збереженню та поповненню фізіологічної антиоксидантної системи, як однієї з важливих систем неспецифічного захисту організму, спрямованих на відновлення гомеостазу [11, 15].

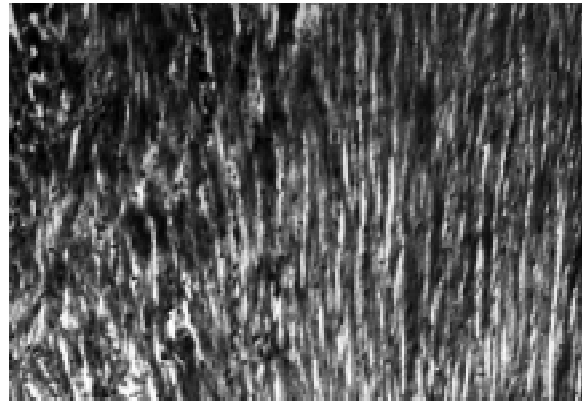
У дослідних тварин зрілого та старечого віку, що одержували елгацин, відмічали нормалізацію морфоструктури міокарда та зворотний розвиток вікових порушень до рівня молодих тварин (Рис. 3Б, 4В). Так, у зрілих тварин практично не відмічали поліморфізму ядер кардіоміоцитів, зон міомаляції. Поперечна посмугованість міофібрил була досить чіткою (Рис. 3Б). У старих щурів були дещо знижені або повністю відсутні порушення мікроциркуляції, явища гіпо- та гіпертрофії м'язевих волокон (Рис. 4В). У жодній тварини цієї групи не було виявлено кардіосклерозу, але зберігалися окремі дрібні ділянки волокон із затушованою поперечною посмугованістю міофібрил, відсутність ядер, а також були помітні зони зі збільшеними міжм'язовими просторами.

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволяють зробити висновок про

Рисунок 2



А. Інтакт — невелике збільшення об'єму та чисельності ядер у нормальних м'язових волокнах, × 250.



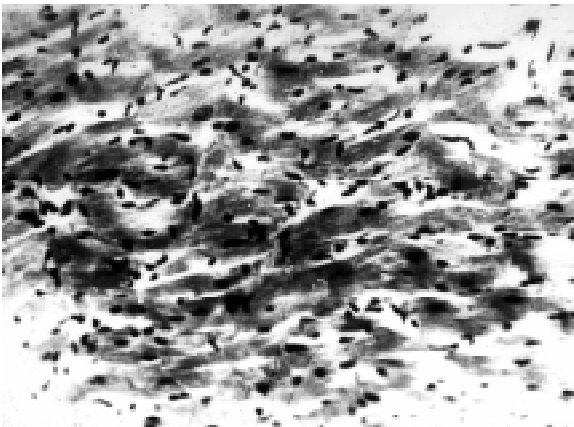
Б. Елгацин — нормалізація чисельності ядер та їх об'єму, × 160.

**Серцевий м'яз щура пубертатного віку (3 міс)**

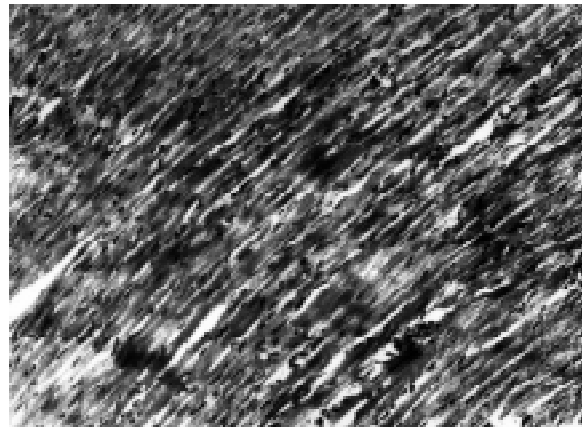
А — інтакт;

Б — після введення елгацину (1 мг/кг). Гематоксилін та еозин.

Рисунок 3



А. Інтакт — поліморфізм окремих ядер. Гіпертрофія частини м'язових волокон, × 250.



Б. Інтакт — м'язові волокна нормальної структури та розмірів, × 160.

**Серцевий м'яз щура зрілого віку (12 міс)**

А — інтакт;

Б — після введення елгацину. Гематоксилін та еозин.

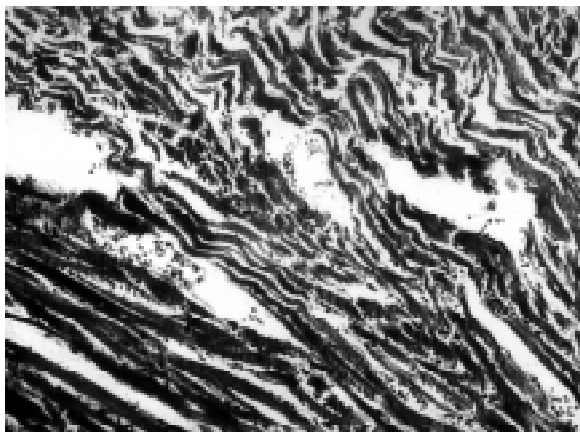
активуючу дію елгацину на серцевий м'яз у тварин зрілого та старечого віку. Профілактичне введення елгацину сприяє усуненню мікроциркуляторних порушень і зворотньому розвитку пов'язаних з ними явищ перебудови та кардіосклерозу. Цей ефект елгацину можна пояснити вираженими антиоксидантними властивостями препарату та його здатністю відновлювати порушену з віком рівновагу системи ПОЛ/АОС міокарда старих тварин, що було встановлено у попередніх дослідженнях [10, 12, 13, 14].

Одержані результати свідчать про виражені геропротекторні властивості елгацину, що відкриває можливості його використання у геріатричній практиці з метою профілактики вікових порушень серцево-судинної системи.

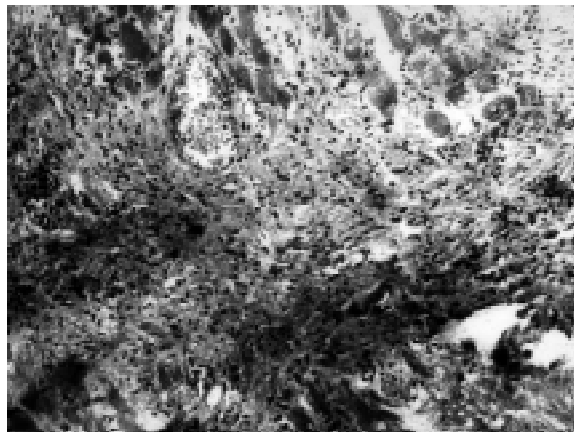
*Висновки*

1. Старіння тварин супроводжується перебудовою морфоструктури міокарда: розвитком гіпертрофії, дистрофії, стоншенням волокон, збільшенням міжм'язового простору та розвитком кардіосклерозу.

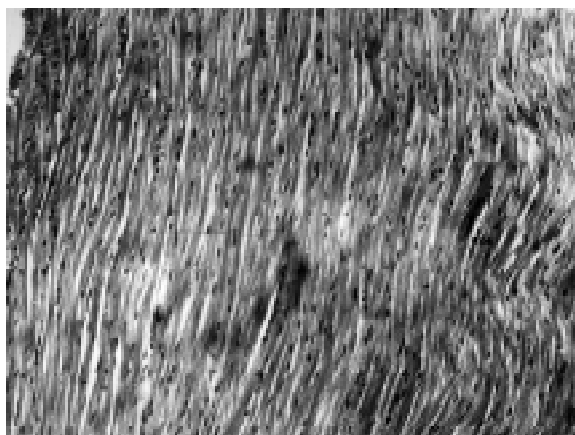
Рисунок 4



А. Інтакт — чергування стоншених, нормальних та гіпертрофованих волокон. Розширення між'язових просторів, капілярна гіперемія, × 160



Б. Інтакт — віковий кардіосклероз, × 160



В. Елгацин — м'язові волокна не змінені, × 160

### Серцевий м'яз щура старечого віку (24 міс)

А, Б — інтакт;

В — після введення елгацину. Гематоксилін та еозин.

2. Елгацин при профілактичному введенні усував мікроциркуляторні порушення у міокарді та розвиток пов'язаних з ними явищ перебудови та кардіосклерозу, що свідчить про його виражені геропротекторні властивості.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Глейзер И.Г. Пожилой возраст: сердечно-сосудистые заболевания и диабет. Липидснижающая терапия у лиц пожилого возраста, стражающих сахарным диабетом // Герiatrics в лекциях: Архив журнала «Клиническая геронтология» 1995-2000 гг. - М.: Ньюдиамед, 2002. - С. 120-151.
2. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. - М.: Издательский дом «Русский врач», 2003. - 154 с.
3. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. - М, 1982. - С. 304.
4. Иванов Ю.И. Погорелюк Р.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований

на микрокалькуляторах по программам.- М.: Медицина, 1990. - 224 с.

5. Левкова Н.А. Морфологические основы сердечной недостаточности в пожилом и старческом возрасте. - М.: Медицина, 1974. - 144 с.

6. Пауков В.С., Фролов В.А. Элементы патологии сердца. - М.: Медицина, 1982. - 272 с.

7. Рибера-Касадо Дж. М. Старение и сердечно-сосудистая система // Герiatrics в лекциях: Архив журнала «Клиническая геронтология» 1995-2000 гг. - М.: Ньюдиамед, 2002. - С. 97-108.

8. Сахарова Т.С. Порівняльне експериментальне вивчення кардіопротекторної активності нових рослинних антиоксидантів на основі біофлавоноїдів та дубильних речовин // Клінічна фармація .- 2001. - Т.5, №1. - С. 64-67.

9. Яковлева Л.В., Карбушева І.В. Динаміка вікових змін активності перекисного окислення ліпідів і антиоксидантної системи в міокарді інтактних щурів та в умовах експериментального ізадринного міокардиту // Вісник фармації. - 2001. - № 3 (27). - С. 139.



10. Яковлева Л.В., Карбушева И.В. Экспериментальное изучение возрастных особенностей влияния эллаговой кислоты на систему ПОЛ/АОС в миокарде интактных крыс // Биологические механизмы старения: Материалы V Междунар. симпоз. - Харьков, 2002. - С. 40-41.
11. Bast Aalt, Halnen Guido R.M.M., Doclam Cus I.A. Oxidants and antioxidants: State of the art // *Americ. J. Med.* - 1991. - No. 3. - P. 2-13.
12. Cutler R.G. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species // *Ann. N.Y.Acad.Sci.* - 1991. - Vol. 621. - P.1-28.
13. McClean G.E. Biomarkers of age and aging: do we know what to look for? // *J.Gerontol.* - 1990. - No. 45. - P. 183-186.
14. Papa S., Skulachev V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // *Molec. Cell. Biochem.* - 1997. - Vol.174. - P. 305-319.
15. Robak Jadwiga, Marcinkiewicz Ewa. Saeveging of reactive oxygen species as the mechanism of drug action // *Pol. J. Pharmacol.* - 1995. - Vol. 47, No. 2. - P. 89-98.
16. Turturo A. et al. Biomarkers of aging: an overview. // *Biomed. Envir. Sci.* - 1991. - No. 4. - P. 130-133.

#### Резюме

Яковлева Л.В., Карбушева И.В., Ларьяновская Ю.Б.

#### Изучение влияния элгацина на морфоструктуру миокарда здоровых крыс разного возраста

Приведены результаты экспериментального исследования влияния препарата «Элгацин», полученного из соплодий ольхи серой (*Alnus cinerea* L.) и ольхи клейкой (*Alnus glutinosa* L.), на возрастные изменения морфоструктуры тканей миокарда здоровых крыс. Установлено, что половое созревание интактных крыс на морфоструктурном уровне сопровождается незначительным увеличением объема ядер кардиомиоцитов и их полиморфизма. У старых животных наблюдали истончение мышечных волокон, а также развитие кардиосклероза.

Профилактическое введение элгацина в дозе 1 мг/кг способствовало устранению микроциркуляторных нарушений и кардиосклероза у старых животных. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования элгацина в гериатрической практике с целью профилактики возрастных изменений сердечно-сосудистой системы.

#### Summary

Yakovleva L.V., Karbusheva I.V., Laryanovska Yu.B.

#### Studying of Elgacin influence on morphostructure of myocardium of different age healthy rats

In the article the results of experimental studying of Elgacin new product, which was obtained from the collective fruit of *Alnus cinerea* L. and *Alnus glutinosa* L., influence on morphostructure of a healthy rat myocardium are given. It was established, that the process of puberty of intact animals at the morphostructural level is accompanied by slight increase of cardiomyocytis nuclei range and their polymorphism. In old animals was observed that muscular fibers are getting thin and also cardiosclerosis developed. Elgacin preventive introduction in a dose of 1 mg/kg promoted vascularis infringements elimination and cardiosclerosis in old animals. The data obtained testify that Elgacin use is in geriatric practice with the purpose of cardiovascular system age changes prevention is prospective.

**Яковлева Лариса Василівна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1978). Д.фарм.н. Професор. Зав. Центральної науково-дослідної лабораторії (ЦНДЛ) НФаУ.

**Карбушева Ірина Вікторівна.** К.б.н. Старший наук. співр. ЦНДЛ НФаУ.

**Лар'яновська Юлія Борисівна.** К.б.н. Старший наук. співр. ЦНДЛ НФаУ.

УДК: 616.37: 615.246.2: 549.67

Яковлева Л.В, Бондарев Є.В., Маслова Н.Ф., Крамаренко О.О.

Національний фармацевтичний університет

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

## Порівняльна оцінка впливу нового ентеросорбенту - гранул цеоліту та сорбогелю на активність панкреатичних ферментів

Вивчено вплив нового ентеросорбенту - гранул цеоліту у порівнянні з вітчизняним ентеросорбентом синтетичного походження ентеросгелем (сорбогелем) на активність панкреатичних ферментів дуоденального вмісту шурів у дослідах *in vitro* та *in vivo* при одноразовому та багаторазовому введеннях. На підставі дослідження *in vitro* можна зробити висновок, що цеоліт і сорбогель сорбують із дуоденального вмісту шурів панкреатичні ферменти (переважно ліполітичного та протеолітичного спектру дії). Виразеність ефекту сорбції визначається як природою панкреатичного ферменту, так і природою препарату — ентеросорбенту.

Екзокринна секреція підшлункової залози (ПЗ) виконує важливу роль у процесі травлення та має складні механізми регуляції.

У процесі екзокринної діяльності ПЗ забезпечує часткову нейтралізацію кислого харчового хімусу, який із шлунка потрапляє у дванадцятипалу кишку, переводить шлункове травлення на кишкове, реалізує порожнинний і початковий пристінковий етапи кишкового травлення.

Кількість і спектр неорганічних і органічних компонентів панкреатичного секрету змінюються у широких межах, будучи адаптованими до виду і складу прийнятої їжі та кишкового вмісту. Це забезпечується складними багаторівнево організованими механізмами регуляції секреторної діяльності ПЗ. Один із них - механізм "негативного" зворотного зв'язку між дванадцятипалою кишкою та ПЗ [1-4].

На основі експериментального та клінічного матеріалу показано, що зворотне гальмування викликається введенням у дванадцятипалу кишку ферментів (протеаз, амілази, ліпази) і гідрокарбонату та має селективний характер (прямо залежить від введеного у дванадцятипалу кишку панкреатичного секрету та його кількості) [2-4].

У роботах [2, 3] із дослідження секреції ПЗ при введенні у дванадцятипалу кишку панкреатичного секрету, а також секрету з адсорбентом (активованим вугіллям) встановлено, що ентеросорбція знімає або знижує гальмівні впливи амілази та трипсину на їх секрецію ПЗ.

Метою даного дослідження є вивчення впливу нового ентеросорбенту - гранул цеоліту у порівнянні із сорбогелем на активність панкреатичних ферментів дуоденального вмісту щурів у досліджах *in vitro* та *in vivo* при одноразовому та багаторазовому введеннях.

#### Матеріали та методи

Вивчення впливу сорбентів на активність панкреатичних ферментів проведено на білих статевозрілих щурах обох статей масою 180-260 г. Показниками функціонального стану ПЗ щурів були рівень активності панкреатичних протеаз, амілази та ліпази. Визначення рівня активності ферментів у дуоденальному вмісті (ДВ) щурів проводили відповідно до [5].

У першій серії дослідів вивчений вплив ентеросорбентів на активність панкреатичних ферментів дванадцятипалої кишки в досліджах *in vitro*. Для цього тварин наркотизували 1 % розчином нембуталу в дозі 0.3 мл на 100 г маси тварини, потім розкривали черевну порожнину і для збору ДВ проводили канюлювання. Одержаний ДВ (по 2 мл) інкубували у термостаті протягом 1 год при темпе-

ратурі 37 °С із 2 мл суспензії препаратів: гранул цеоліту (досліджуваний препарат) та сорбогелю (препарат порівняння).

Суспензії препаратів готували таким чином, щоб кожні 2 мл містили 68 мг цеоліту або 270 мг сорбогелю, відповідно, виходячи із розрахункового зіставлення терапевтичної дози препарату для людини у перерахунку на тварин (щурів) із застосуванням формули Риболовлева Ю.Р. [6].

Контролем були проби, у яких ДВ інкубували із 2 мл дистильованої води.

У другій серії дослідів вивчений вплив ентеросорбентів на активність панкреатичних ферментів у досліджах на щурах при одноразовому та тривалому (протягом 2 і 6 тижнів) введенні препаратів.

Препарати вводили внутрішньошлунково в умовно-терапевтичних дозах, що становлять 0.5 г/кг для цеоліту і 2.1 г/кг для препарату порівняння сорбогелю. Вибір дози сорбогелю здійснювали, виходячи із добової дози препарату для людини у перерахунку на тварин (щурів) із застосуванням формули Риболовлева Ю.Р. [6]. Групам тварин інтактного контролю в еквівалентному об'ємі вводили дистильовану воду. Відповідно до вимог з біоетики після експерименту тварин піддавали евтаназії (внутрішньоочередово вводили нембутал у дозі 1.5 мл/100 г).

Весь фактичний матеріал оброблений за програмою «PAT 0.2. exe» і за спеціальною програмою «Statistica 5.0 for Windows». Вірогідність результатів розраховували із застосуванням параметричного критерію Стюдента (t).

#### Результати досліджень та їх обговорення

У Табл. 1 представлені результати вивчення впливу гранул цеоліту і сорбогелю на ак-

Таблиця 1  
Вплив ентеросорбентів на активність панкреатичних ферментів дуоденального вмісту щурів у досліджах *in vitro*

Умови експерименту	n	Активність панкреатичних ферментів				
		Амілаза, г/(год · л)	n	Ліпаза, мкмоль/ год · мл	n	Протеази, ммоль тирозину / год · мл
дуоденальний вміст	5	13545.00 ± 211.48	4	12.73 ± 1.12	4	4.74 ± 0.09
дуоденальний вміст + сорбогель	3	13567.48 ± 65.54	6	6.67 ± 0.38*	4	2.86 ± 0.06*
дуоденальний вміст + гранули цеоліту	3	13827.64 ± 131.09	3	6.66 ± 1.72*	4	3.27 ± 0.05**/**

#### Примітки:

n — кількість дослідів;

\* — відхилення вірогідне по відношенню до групи інтактного контролю;

\*\* — відхилення вірогідне по відношенню до досліджуваної групи із введенням сорбогелю.

Таблиця 2

Вплив ентеросорбентів на активність панкреатичних ферментів дуоденального вмісту щурів у досліджах *in vivo*

Умови експерименту	Активність панкреатичних ферментів					
	п	Амілаза, г/ (год · л)	п	Ліпаза, мк моль / год · мл	п	Протеази, ммоль тирозину / год · мл
одноразове введення препаратів						
інтактний контроль	5	17800.0 ± 1938.23	6	16.90 ± 3.00	7	4.71 ± 1.47
сорбогель (2100 мг/кг)	6	29280.0 ± 515.02*	5	23.25 ± 1.13*	6	8.75 ± 0.25*
гранули цеоліту (500 мг/кг)	5	25024.0 ± 2351.90*	6	20.15 ± 1.04**/**	6	6.75 ± 0.79**/**
двотижневе введення препаратів						
інтактний контроль	4	15946.64 ± 143.28	6	14.73 ± 1.09	5	4.07 ± 0.18
сорбогель (2100 мг/кг)	5	21422.23 ± 381.49*	6	24.03 ± 1.12*	8	6.13 ± 0.54*
гранули цеоліту (500 мг/кг)	4	19111.11 ± 1525.97*	7	22.23 ± 1.40*	6	5.68 ± 0.27 *
шеститижневе введення препаратів						
інтактний контроль	5	16390.24 ± 1311.74	5	15.62 ± 1.17	6	4.39 ± 0.71
сорбогель (2100 мг/кг)	6	24936.58 ± 2549.05 *	6	25.48 ± 1.79 *	6	7.00 ± 0.67*
гранули цеоліту (500 мг/кг)	6	23442.51 ± 1948.31 *	6	24.86 ± 1.96*	6	6.12 ± 0.56*

Примітки:

п — кількість тварин у групі;

\* — відхилення вірогідне по відношенню до групи інтактного контролю;

\*\* — відхилення вірогідне по відношенню до досліджуваної групи із введенням сорбогелю.

тивність панкреатичних ферментів у ДВ у досліджах *in vitro*.

Із Табл. 1 видно, що інкубація ДВ із препаратами призводить до вірогідного зниження рівня активності панкреатичної ліпази та протеаз. Так, рівень активності панкреатичної ліпази після інкубації із препаратами (як цеолітом, так і сорбогелем) знизився на 48 %. Рівень активності панкреатичних протеаз у ДВ після інкубації із цеолітом знизився на 31 %, після інкубації із сорбогелем — на 39.7 %. Активність панкреатичної амілази після інкубації ДВ із препаратами протягом 1 год не змінювалася.

Розходження у сорбційних властивостях препаратів щодо протеолітичних ферментів ДВ щурів є статистично значущими. Зазначене можна пояснити різною хімічною природою ентеросорбентів: цеоліт є кристалічним алюмосилікатом природного походження, а сорбогель - гідрогель метилкремнієвої кислоти синтетичного походження, що забезпечує різну адсорбційну ємність препаратів.

У другій серії дослідів вивчений вплив ентеросорбентів на активність панкреатичних ферментів у досліджах *in vivo*.

Для дослідження впливу одноразового введення цеоліту та сорбогелю на активність панкреатичних ферментів препарати вводили щурам за 3 год до взяття проб. Як видно з даних, наведених у Табл. 2, одноразове ве-

дення препаратів призводить до достовірного збільшення активності панкреатичних ферментів у ДВ щурів. При введенні цеоліту активність амілази зростає на 40 %, при введенні сорбогелю — на 64 %. Невідповідність цих даних результатам, одержаним у досліджах *in vitro*, чітко вписується в уявлення про регуляторний механізм зворотного гальмування секреції ферментів підшлункової залози. В умовах *in vitro* відбувається однобічний процес адсорбції ферментів з ДВ, а в умовах *in vivo* зниження вмісту ферментів стимулює їх секрецію підшлунковою залозою.

Активність панкреатичної ліпази у ДВ щурів після одноразового введення цеоліту підвищується на 19 %; після введення сорбогелю — на 37.5 %. Активність панкреатичних протеаз у ДВ після одноразового введення препаратів також підвищується: на 43 % при введенні цеоліту і на 85 % при введенні сорбогелю. Розходження у вираженості сорбційних властивостей препаратів щодо протеолітичних і ліполітичних ферментів ДВ щурів є статистично значущими, що узгоджується з даними, одержаними в досліджах *in vitro*, і свідчить про більш м'яку сорбційну дію цеоліту.

Тривале (протягом 2 і 6 тижнів) уведення ентеросорбентів також призводить до вірогідного підвищення активності панкреатичних ферментів у ДВ. Так, наприклад, відсоток

підвищення активності амілази за тривалого введення цеоліту коливається від 19 % до 43 %; сорбогелю - від 34 % до 52 %.

Таким чином, чим триваліший термін введення препаратів, тим сильніше невілюється різниця в їх адсорбційній дії.

#### Висновок

Результати дослідів *in vitro* свідчать, що цеоліт і сорбогель сорбують із ДВ шурів панкреатичні ферменти ліполітичної та протеолітичної дії, причому вираженість ефекту визначається як природою панкреатичного ферменту, так і природою препарату – ентєросорбенту.

Одноразове та багаторазове введення ентєросорбентів в експерименті *in vivo* призводить до підвищення активності панкреатичних ферментів у ДВ, що узгоджується з даними літератури про вплив екзогенних ентєросорбентів на секрецію ПЗ: ентєросорбенти, що знаходяться у порожнині дванадцятипалої кишки, сорбують панкреатичні ферменти, чим виключають їх з участі у гальмуванні секреції ПЗ за принципом «негативного» зворотного зв'язку і фактично стимулюють секрецію ферментів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Руководство по гастроэнтерологии: В 3 т. / Под ред. Ф.И. Комарова. - М.: Медицина, 1996. - 720 с.
2. Коротько Г.Ф. Саморегуляция секреции поджелудочной железы // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. - 1990. - Т. 76, № 10. - С. 1426-1430.
3. Коротько Г.Ф. Регуляция секреции поджелудочной железы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 1999. - № 4. - С. 6-14.
4. Коротько Г.Ф., Абдурахманов А.Х., Лемешкина Г.С. Адсорбция панкреатических ферментов тонкой кишкой как один из механизмов сопряжения полостного и пристеночного кишечного пищеварения // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. - 1992. - Т. 78, № 8. - С. 164-169.
5. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению ферментных препаратов, улучшающих процесс пищеварения / Под ред. Н.Ф. Масловой. - 2001. - 24 с.

#### Резюме

Яковлева Л.В, Бондарев Е.В.,  
Маслова Н.Ф., Крамаренко Е.А.

#### Сравнительная оценка влияния нового энтєросорбента - гранул цеолита и сорбогеля на активность панкреатических ферментов

Изучено влияние нового энтєросорбента - гранул цеолита в сравнении с отечественным энтєросорбентом

синтетического происхождения энтєросгелем (сорбогелем) на активность панкреатических ферментов дуоденального содержимого крыс в опытах *in vitro* и *in vivo* при однократном и многократном введениях. На основании исследования *in vitro* можно сделать вывод, что цеолит и сорбогель сорбируют из дуоденального содержимого крыс панкреатические ферменты (преимущественно липолитического и протеолитического спектра действия). Выраженность эффекта сорбции определяется как природой панкреатического фермента, так и природой препарата - энтєросорбента.

#### Summary

Yakovleva L.V., Bondarev E.V.,  
Maslova N.F., Kramarenko E.A.

#### Comparative assessment of new enteric sorbent – Zeolite granules and Sorbogel influence on pancreatic enzyme activity

The influence of new enteric sorbent – Zeolite granules compared with the Enterosgel (Sorbogel) native synthetic enteric sorbent on pancreatic enzyme activity of rat duodenal content in experiments *in vitro* and *in vivo* at once – day administration and multiple-dose administration was studied. In terms of study *in vitro* we can do the conclusion, that Zeolite and Sorbogel absorb pancreatic enzymes (mainly with lipolytic and proteolytic spectrum of activity) from rat duodenal content. The intensity of sorption effect is determined by both pancreatic enzyme nature and nature of substance – enteric sorbent.

**Яковлева Лариса Василівна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1978). Д.фарм.н. Професор. Зав. Центральної науково-дослідної лабораторії (ЦНДЛ) НФаУ.

**Бондарев Євген Вікторович.** Закінчив Українську фармацевтичну академію та Харківський державний університет (1999). Аспірант ЦНДЛ НФаУ (2001). Мол. наук. співр. ЦНДЛ НФаУ (2003).

**Маслова Наталія Федорівна.** Закінчила Харківський державний університет (1971). Працює в ДП ДНЦЛЗ (від 1972). Учений секретар ДП ДНЦЛЗ. Д.б.н. (1994). Професор. Зав. лабораторії біохімічної фармакології ДП ДНЦЛЗ.

**Крамаренко Олена Олексіївна.** Закінчила Харківський державний університет (1990). Працює в ДП ДНЦЛЗ (від 1990). Наук. співр. лабораторії біохімічної фармакології (2002).

УДК 616.36-002:623.233.1: 615.244

Деримедведь Л.В., Демьяненко В.Г., Бодри Хамам Салих, Демьяненко Д.В.  
Национальный фармацевтический университет

### Изучение влияния препарата «Силицетин» на течение экспериментального тетрахлорметанового гепатита

Установлено, что препарат «Силицетин» обладает антиоксидантным и антицитологическим действием. При экспериментальном  $CCl_4$ -гепатите у крыс гепатопротекторная активность изучаемого препарата и препарата сравнения кверцетина проявлялась следующим образом: силицетин > кверцетин. Реализация гепатопротекторного действия препарата «Силицетин», очевидно, связана с непосредственным угнетением процессов СРО и цитолиза в гепатоцитах.

По данным статистики хронический гепатит (ХГ) составляет 8-10 % от всей гастроэнтерологической патологии [2]. Как самостоятельное заболевание, так и как следствие многих патологических процессов ХГ вне зависимости от этиологии имеет целый ряд общих патологических факторов. Одним из них является активация процессов свободнорадикального окисления (СРО) с последующей деструкцией мембранных структур гепатоцитов, нарушением липид-липидных и белок-липидных взаимоотношений, разобщением процессов окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания и др. [1-3]. Этот процесс сопровождается «сбоем» функционирования антиоксидантной системы как гепатоцитов, так и крови, что обеспечивает каскадный характер поражения. Поэтому в терапии ХГ широко используются антиоксиданты или препараты, в механизме действия которых важная роль отводится антиоксидантному действию [3, 4].

Целью наших исследований явилось изучение фармакологической активности препарата «Силицетин», разработанного на основе масла плодов расторопши пятнистой в комбинации с кверцетином. Выбор указанной комбинации обусловлен данными о том, что кверцетин оказывает выраженный антиоксидантный эффект, а масло расторопши пятнистой – гепатозащитный, что позволяет предположить наличие синергических взаимодействий при их совместном применении [5, 7-11].

#### Материалы и методы

Испытуемый препарат «Силицетин» создан на основе комбинации масла расторопши с кверцетином в виде суспензии в соотношении 1:10. Для получения устойчивой суспензии был использован стабилизатор спен-65, консервантом являлся нипазол. Указанная суспензия готовилась по следующей технологии. В реактор с турбинной или дисковой мешалкой со скоростью вращения

5000 об/мин загружали 30 г масла расторопши, 3.0 г кверцетина, прибавляли 0.4 г спена-65 и 0.07 г нипагина и диспергировали смесь в течение 15-20 мин [9]. Полученную массу дозировали в твердые желатиновые капсулы.

В качестве препарата сравнения использован кверцетин.

Опыты проводились на 60 крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г. В каждой группе было по 15 животных.

Гепатит у крыс вызывали путем подкожных инъекций 50 % масляного раствора  $CCl_4$  по 0.2 мл/100 г массы тела животного 2 раза в неделю в течение 60 сут. Изучаемый препарат и препарат сравнения вводили ежедневно в течение всего срока формирования патологии перорально в дозе 0.5 мг/кг (доза  $ED_{50}$  установлена экспериментально по гепатозащитному действию). По окончании исследований проводили эвтаназию животных.

По методикам [1, 4, 6] в гомогенате печени определяли содержание продуктов СРО: малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа (ОШ). В сыворотке крови измеряли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГТП), содержание билирубина, липидов и белка. Результаты обрабатывали по параметрическому t-критерию Стьюдента.

#### Результаты и их обсуждение

Результаты исследований представлены в Табл. 1-2.

Как видно из результатов эксперимента, интоксикация  $CCl_4$  в течение 2 мес. сопровождается существенными изменениями в печени. В гомогенате органа увеличилось содержание маркеров липопероксидации: ДК, МДА и ОШ в 9; 2.1 и 3.7 раз, соответственно (Табл. 1).

Таблица 1

**Влияние препаратов силицетин и кверцетин на интенсивность процессов липопероксидации в печени крыс при хроническом CCl<sub>4</sub>-гепатите (M ± m)**

Условия опыта	МДА, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г	ОШ, мкмоль/г
интактные животные	98.4 ± 1.4	1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.3
животные с гепатитом (контроль)	206.64 ± 9.5*	12.6 ± 0.3*	6.66 ± 0.3*
силицетин	115.8 ± 3.2**	8.42 ± 0.3**	2.2 ± 0.3**
кверцетин	158.9 ± 7.6**	10.5 ± 0.3**	3.17 ± 0.5**

\* — достоверно по сравнению с интактными животными (p ≤ 0.05);

\*\* — достоверно по сравнению с нелечеными животными (p ≤ 0.05).

Таблица 2

**Влияние препаратов силицетин и кверцетин на основные биохимические показатели сыворотки крови крыс при хроническом CCl<sub>4</sub>-гепатите у крыс (M ± m)**

Показатель	Интактные животные	CCl <sub>4</sub> -гепатит (нелеченные животные)	Силицетин	Кверцетин
АлАТ, мккат/л	0.83 ± 0.02	1.4 ± 0.2	0.73 ± 0.06	0.53 ± 0.03**
АсАТ, мккат/л	0.58 ± 0.04	0.87 ± 0.03*	0.77 ± 0.05	0.65 ± 0.04**
ЩФ, ЕД/л	234.5 ± 4.1	351.8 ± 7.9*	299.8 ± 7.8**	270.5 ± 5.8**
ГТП, мккат/л	0.31 ± 0.05	0.5 ± 0.04*	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.07
общий билирубин, мккат/л	12.5 ± 0.2	21.25 ± 2.6*	17.7 ± 0.3**	18.5 ± 0.4**
непрямой билирубин, мккат/л	1.21 ± 0.2	1.9 ± 0.5*	1.32 ± 0.2**	1.4 ± 0.3**
общие липиды, г/л	3.1 ± 0.2	4.2 ± 0.3*	3.6 ± 0.4	3.74 ± 0.9
общий белок, г/л	80.0 ± 1.5	67.4 ± 1.3*	78.5 ± 1.5	78.0 ± 1.3

\* — достоверно по сравнению с интактными животными (p ≤ 0.05);

\*\* — достоверно по сравнению с нелечеными животными (p ≤ 0.05).

В сыворотке крови отмечается выраженная гипертрансферазemia. Усилился холестаз, о чем свидетельствует повышение уровня ЩФ в 1.5 раза и ГТП в 1.6 раза. Интоксикация CCl<sub>4</sub> привела к развитию гипербилирубинемии, гипергликемии, гиперлипидемии и снижению уровня общего белка (Табл. 2).

Применение препаратов силицетин и кверцетин улучшило функциональное состояние печени, о чем свидетельствует нормализация основных биохимических показателей. Под влиянием силицетина уровень ДК уменьшился в 1.5 раза; МДА в — 1.8 раза; ОШ в - 3 раза. (Табл. 1). На фоне применения кверцетина уровень ДК уменьшился в 1.2 раза; МДА - в 1.3 раза, ОШ в 2.1 раза (Табл. 1).

Таким образом, по степени ингибирующего влияния на интенсивность процессов СРО в печени активность препаратов-антиоксидантов проявлялась следующим образом: силицетин > кверцетин.

Изучение влияния препаратов силицетин и кверцетин на биохимические показатели сыворотки крови показало сходный результат.

По степени ингибирования цитолитических процессов наиболее активным был кверцетин (снижение уровня АлАТ и АсАТ в 1.5 и

1.4 раза, соответственно). В то же время по степени ингибирования холестатических процессов более эффективным было использовано силицетина (Табл. 1, 2).

Влияние же изучаемых средств на метаболические процессы в печени было соизмеримо. Так, под влиянием препарата «Силицетин» наблюдалось снижение уровня билирубина (общего и непрямого) в среднем в 1.2 и 1.4 раза, соответственно (для кверцетина — в 1.15 и 1.3 раза, соответственно) (Табл. 2). Аналогичным было и действие на белок - и липидсинтетические процессы в печени. Содержание общего белка на фоне применения силицетина и кверцетина повысилось в 1.2 раза, а общих липидов — снизилось в 1.2 раза.

Следует отметить, что достоверных отличий по степени влияния на показатели холестаза, уровень билирубина, общего белка и липидов между силицетином и кверцетином не отмечено, что свидетельствует об однотипности их действия.

В то же время, более высокая антиоксидантная и антицитолитическая активность силицетина по сравнению с кверцетином нами объясняется следующим. Как известно, метаболизм тетрахлорметана осуществляет микросомальной цитохром Р-450-зависи-

мой системой печени, окисляющей этот гепатотоксин с образованием свободных радикалов и электрофильных ковалентносвязывающихся интермедиатов [2]. При этом отмечается наиболее высокая генерация таких высокоактивных форм кислорода (АФК) как супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и синглетно-возбужденный кислород ( $^1O_2$ ). Эти АФК, наряду с наблюдаемой при  $CCl_4$ -гепатите конверсий цитохрома Р-450 в метаболически инертный цитохром Р-420 [2, 3, 9], способствуют активации процессов СРО (маркеры: МДА, ДК, ОШ), цитолиза (маркеры: АлАТ, АсАТ) и холестаза (маркеры: ГПТ, ЩФ).

Благодаря комплексному составу силицетин ингибирует процессы СРО. Наличие жирных полиненасыщенных кислот в препарате способствует стабилизации мембранных структур гепатоцитов, что приводит к повышению устойчивости мембран к липоперекисной деструкции.

Кверцетин также оказал положительное действие на гепатоциты. Как считают авторы, это обусловлено тем, что, обладая антиоксидательной и антирадикальной активностью, он ингибирует процесс липопероксидации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейших фармакологических исследований силицетина как перспективного антиоксидантного и антицитологического средства для комплексной терапии гепатобилиарной патологии.

**Выводы**

1. Для препарата «Силицетин» установлено наличие гепатозащитного действия, реализация которого, очевидно, связана с непосредственным угнетением процессов СРО и цитолиза в гепатоцитах.

2. При экспериментальном  $CCl_4$ -гепатите у крыс антиоксидантная и антицитолитическая активность исследуемого препарата и препарата сравнения проявилась следующим образом: силицетин > кверцетин.

3. Препараты силицетин и кверцетин оказывают однотипное воздействие на основные метаболические процессы в печени.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Методические рекомендации. — СПб.: ИКФ "Фолиант", 2000. — 104 с.  
2. Арчаков А.И., Карузина И.И. Окисление чужеродных соединений и проблемы токсикологии // Вестник АМН СССР. — 1988. — № 1. — С. 14-23.

3. Бабак О.Я. Хронические гепатиты. — Киев: АО «Издательство Билиц-Информ», 1999. — 208 с.  
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.  
5. Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Украинский медицинский альманах. — 1999. — Т.2, № 4. — С.184.  
6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.  
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2-х томах. - Т. 2. - М.: ООО «Издательство Новая Волна» , 2000. — С. 91.  
8. Пат. 2014840 РФ, МКИ А61К 65/78. Средство, обладающее ранозаживляющим и гепатопротекторным действием / Лебедев А.А., Симерзина Л.В., Лебедев П.А. (Россия); Самарагробанк. - № 5043755/14; Заявл. 30.03.92; Опубл. 30.6.94, Бюл. № 12. - 4 с.  
9. Пат. 63301 Україна, МКВ А61К 35/78. Гепатопротекторний лікарський засіб «Силицетин» (варіанти) / Дем'яненко В.Г. (Україна), Бодрі Хамам Саліх (Судан), Деримедвідь Л.В. (Україна), Дроговоз С.М. (Україна) та ін.; Національний фармацевтичний університет. — Заявл. 31.03.03; опубл. 15.01.04, Промислова власність. - 2004. — №1. — 4 с.  
10. Morazzoni P., Bombardelli E. Silybum marianum // Fitoterapia. — 1995. — Vol. 66, No. 1. — P. 166-171.  
11. Rankov D., Panatiouva S., Bizhev A. Composition and possibility of utilization of Silybum marianum seeds // Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod. (Proc.) 3<sup>rd</sup>. - 1985. - Vol. 4. — P. 140-144.

**Резюме**

Деримедвідь Л.В., Дем'яненко В.Г., Бодрі Хамам Саліх, Дем'яненко Д.В.

**Вивчення впливу препарату «Силицетин» на перебіг експериментального тетрахлорметанового гепатиту**

Встановлено, що препарат «Силицетин» виявляє антиоксидантну та антицитологічну дію. При експериментальному  $CCl_4$ -гепатиті у щурів гепатопротекторна активність випробовуваного препарату та препарату порівняння кверцетин виявлялася таким чином: силицетин > кверцетин. Реалізація гепатопротекторної дії, напевно, пов'язана із безпосереднім пригніченням процесів ВРО та цитолізу в гепатоцитах.

**Summary**

Derimedved L.V., Demyanenko V.G., Bodri Khamam Salykh, Demyanenko D.V.

**Studying of Silycetin product influence on experimental tetrachlormethanoic hepatitis course**

It was established that Silycetin product has anti-oxidative and anticytological effect. In rats with experimental  $CCl_4$ -hepatitis, the hepatoprotective effect of the studied and reference (Quercetin) products was shown as follows: Silycetin > Quercetin. Apparently, realization of Silycetin product hepatoprotective effect is associated with direct suppression of free radical oxidation and cytolysis processes in hepatocytes.

**Деримедведь Людмила Виталиевна.** К.мед.н. Доцент кафедры фармакологии Национального фармацевтического университета.

**Демьяненко Виктор Григорьевич.** Д.фарм.н. (1991). Профессор (1992) кафедры заводской тех-

нологии лекарств (ЗТЛ) Национального фармацевтического университета (НФаУ).

**Богри Хамам Салих.** Аспирант кафедры ЗТЛ НФаУ (2001).

**Демьяненко Дмитрий Викторович.** Ассистент кафедры ЗТЛ НФаУ (2002).

## У ДП «Державний науковий центр лікарських засобів»

6-8 квітня 2004 року  
у ДП «Державний науковий центр лікарських засобів»  
відбулася відкрита науково-практична конференція  
молодих учених та спеціалістів

### Наукові досягнення у галузі створення лікарських засобів: технологія, аналіз, фармакологія

Журнал «Фармаком» публікує матеріали конференції у вигляді наукових статей.

УДК 615.454.2:616-002.5.015

Романова Я.Ю.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

### Біофармацевтичні дослідження при створенні нового комбінованого протитуберкульозного препарату у формі супозиторіїв

Досліджено залежність кінетики вивільнення лікарських речовин (ізоніазид, рифампіцин і піразинамід) із супозиторіїв від типу основи. Вивчено вплив розміру часток рифампіцину на біофармацевтичні властивості супозиторіїв. На підставі результатів проведених досліджень науково та експериментально обгрунтовано вибір супозиторної основи та розміру часток лікарської речовини при створенні нового комбінованого протитуберкульозного препарату у формі супозиторіїв.

Епідемія туберкульозу в Україні, що була зареєстрована експертами ВООЗ в 1995 році, продовжує прогресувати і вимагає невідкладних заходів боротьби з цим небезпечним інфекційним захворюванням. Однією з істотних причин зростання епідемії туберкульозу є поширення лікарської резистентності, тобто втрата чутливості мікобактерій туберкульозу, принаймні, до одного лікарського препарату. Полірезистентні форми туберкульозу становлять (10-15) % від числа первинних випадків захворювання. Повторна резистентність виникає внаслідок неконтрольованого проведення антибактеріальної терапії. Полірезистентність мікобактерій туберкульозу є не тільки найсерйознішою лікарською, а й економічною проблемою, бо вартість лікування полірезистентної форми туберкульозу зростає майже у 100 разів [1, 2, 3, 4].

Уникнути розвитку резистентності мікобактерій до препаратів при лікуванні туберкульозу дозволяє одночасне використання декількох туберкулостатиків. Використання

комбінованих туберкулостатиків сприяє також проведенню контрольованої хіміотерапії, зменшенню терміну та вартості лікування.

Одними з основних протитуберкульозних препаратів є ізоніазид, рифампіцин, піразинамід. Комбінація цих препаратів з оптимальним дозуванням входить до «Модельного переліку життєво необхідних ліків» ВООЗ.

Провідні фармацевтичні компанії США, Англії, Індії вже близько 20 років виробляють комбіновані протитуберкульозні препарати із фіксованим дозуванням у вигляді таблеток.

Відомо, що хіміотерапія туберкульозу супроводжується значними побічними явищами, що не дає можливості проводити повний курс лікування. Пероральне використання туберкулостатиків призводить до шлунково-кишкових розладів, порушень функції печінки, алергічних реакцій та ін. Усі ці побічні явища можуть бути зведені до мінімуму за умови зміни перорального шляху введення протитуберкульозних препаратів на ректаль-



ний та раціонального вибору складу препарату.

Метою проведеного дослідження було науково-експериментальне обґрунтування вибору типу основи-носія та розміру часток лікарських речовин при створенні нового вискоєфективного та безпечного комбінованого протитуберкульозного препарату у формі супозиторіїв з оптимальним дозуванням рифампіцину, піразинаміду, ізоніазиду.

*Об'єкти та методи дослідження*

Об'єктами дослідження були супозиторні основи: гідрофобні (вітепсол W35, твердий жир, естерам), гідрофільна (суміш поліетиленоксидів різної молекулярної маси) і супозиторії з комбінацією рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду, виготовлені на вищезазначених основах.

Вивільнення лікарських речовин із різних основ вивчали мембранно-діалізім методом *in vitro* на імітаторі абсорбції фірми «Сарторіус» із камерою типу SM 16754 [5, 6]. Дослідження проводили при температурі 37 °С при перемішуванні магнітною мішалкою зі швидкістю 100 об/хв протягом 6 год. Як напівпроникну мембрану використовували діалізуючу мембрану товщиною 5.5 мм фірми «Hoechst». Діалізім середовищем була вода (100 мл). Через кожну годину аналізували вміст лікарських речовин у діалізаті. Для визначення кількісного вмісту рифампіцину використовували спектрофотометричний метод. Кількість ізоніазиду та піразинаміду в діалізімному середовищі визначали методом рідинної хроматографії за методикою [8].

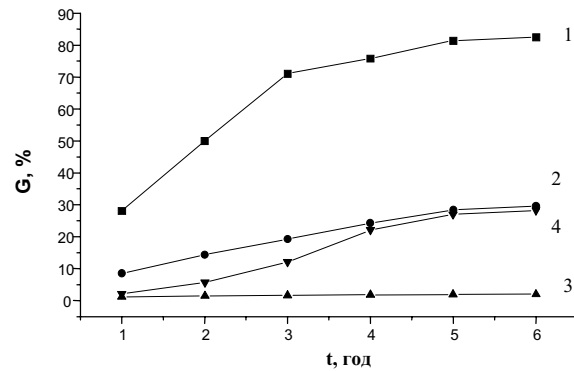
*Результати та їх обговорення*

Специфічність дії розроблюваного комбінованого препарату полягає в тому, що лікарські речовини мають спочатку швидко вивільнятися, потім одночасно досягати максимальних доз та якомога довше утримуватися в організмі. Слід зазначити, що лише оптимальне поєднання лікарських речовин та супозиторної основи може гарантувати високу терапевтичну ефективність препарату.

Супозиторії на різних основах виготовляли методом виливання. Лікарські речовини вводили в основи у вигляді суспензії дрібнодисперсного порошку і вивчали фізико-хімічні та фармако-технологічні властивості супозиторіїв. Зразки супозиторіїв, показники якості яких відповідали вимогам [7], використовували для вивчення кінетики вивільнення із них лікарських речовин.

На підставі одержаних результатів будували графіки залежності ступеня вивільнення рифампіцину від часу із основ різної природи (Рис. 1).

Рисунок 1



**Залежність ступеня вивільнення рифампіцину (G, %) із комбінованих супозиторіїв від часу (t, год)**

- 1 — вітепсол W35;
- 2 — твердий жир;
- 3 — естерам;
- 4 — поліетиленоксидна основа.

За швидкістю та повнотою вивільнення рифампіцину із супозиторіїв досліджувані основи можна розташувати в такій послідовності: вітепсол W35 > твердий жир > естерам > поліетиленоксидна основа. Найбільш повне та швидке вивільнення лікарської речовини спостерігалось зі зразків супозиторіїв, виготовлених на вітепсолі W35. Одержані результати показали, що із гідрофільної основи рифампіцин практично не вивільняється (1-2%).

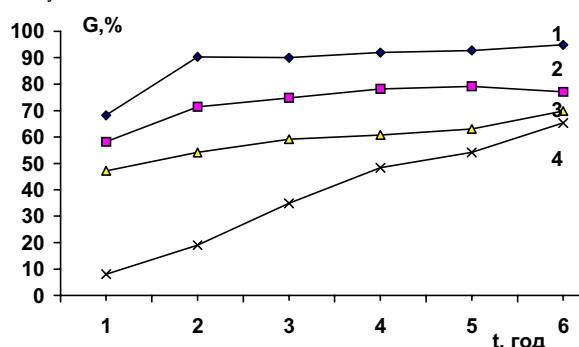
Із Рис. 1 видно, що криві вивільнення рифампіцину із гідрофобних основ значно відрізняються між собою. Так, за першу годину від початку досліду із вітепсолу W35 вивільнилося 28.11 % лікарської речовини, із твердого жиру — 8.52 %, із естераму — лише 2.06 %. Через 3 години кількість рифампіцину, що виділився у діалізат із супозиторіїв на основі вітепсолу W35, досягла максимуму і зберігалася протягом подальших 3 годин на рівні (70-80) %, що дає можливість прогнозувати пролонгованість дії досліджуваних зразків супозиторіїв. Ступінь вивільнення рифампіцину із твердого жиру та естераму значно менша (через 3 год — 19.26 % та 12.08 %, а через 6 год — 29.57 % та 28.21 %, відповідно). Таким чином, в результаті проведеного дослідження було виявлено, що поліетиленоксидна основа не забезпечує вивільнення рифампіцину із супозиторіїв і не може бути використана для розробки комбі-

нованих супозиторіїв, твердий жир та естерам також у недостатній мірі сприяють вивільненню лікарської речовини. У той же час вітепсол W35 забезпечує найбільш повне та пролонговане вивільнення рифампіцину, що дозволяє протягом тривалого часу підтримувати ефективну концентрацію лікарської речовини в біологічних рідинах.

Результати вивчення впливу супозиторних основ на вивільнення ізоніазиду та піразинаміду представлені на Рис. 2 та Рис. 3.

Із результатів дослідження, представлених на Рис. 2 видно, що вже через 1 год від початку експерименту спостерігалася різниця у

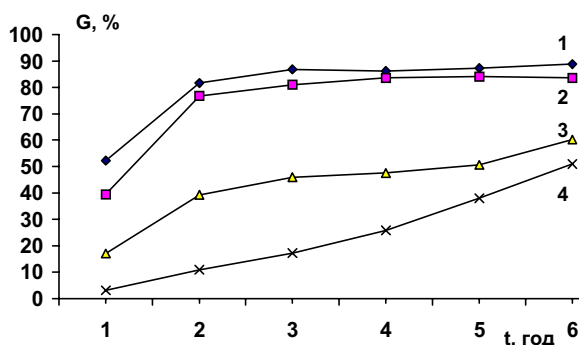
Рисунок 2



Залежність ступеня вивільнення ізоніазиду (G, %) із комбінованих супозиторіїв від часу (t, год)

- 1 — вітепсол W35;
- 2 — твердий жир;
- 3 — естерам;
- 4 — поліетиленоксидна основа.

Рисунок 3



Залежність ступеня вивільнення піразинаміду (G, %) із комбінованих супозиторіїв від часу (t, год)

- 1 — вітепсол W35;
- 2 — твердий жир;
- 3 — естерам;
- 4 — поліетиленоксидна основа.

кількості вивільненого в діалізат ізоніазиду із супозиторіїв у залежності від природи основи. За перший час із вітепсолу W35 вивільнилося ізоніазиду 68.12 %, із твердого жиру — 58.2 %, із естераму — 47.14 %, із поліетиленоксидної основи — 8.13 %. Через 2 год. від початку експерименту концентрація ізоніазиду при вивільненні зі всіх гідрофобних основ практично досягла максимального значення. Кількість ізоніазиду, що вивільнилася в діалізне середовище із вітепсолу W35, складала 90 % і була в 1.1 рази більшою ніж із твердого жиру, в 1.7 рази більшою ніж із естераму та в 4.7 рази більшою ніж із поліетиленоксидної основи. Для гідрофобних основ ця залежність зберігалася до кінця досліду. Вивільнення ізоніазиду із поліетиленоксидної основи відбувалося інакше: кількість лікарської речовини збільшувалася у діалізаті поступово і мала максимальний показник лише через 6 год. Отже, найвищу ступінь вивільнення ізоніазиду (більше 90 %) вже через 2 год забезпечувала супозиторна основа вітепсол W35. Слід відзначити також, що у цьому разі максимальна концентрація ізоніазиду зберігалася до кінця досліду.

Як видно із Рис. 3, ступінь вивільнення піразинаміду також залежить від природи основи. Із гідрофобних основ піразинамід вивільнявся швидше, ніж із гідрофільної основи. Кількість лікарської речовини у діалізаті через 1 год від початку досліду після вивільнення із вітепсолу W35, твердого жиру, естераму, поліетиленоксидної основи складала 52.33 %; 39.45 %; 17.0 % та 3.12 %, відповідно. Протягом подальшого дослідження характер кривих вивільнення піразинаміду із гідрофобних основ зберігав аналогічну залежність. Із гідрофільної основи лікарська речовина вивільняється дуже повільно. Максимальне вивільнення піразинаміду спостерігалось із вітепсолу W35 через 2-3 год і складало майже 87 %.

Порівнюючи результати дослідження процесів вивільнення всіх діючих речовин комбінованих супозиторіїв: рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду із різних основ, слід відмітити, що вони характеризуються певними спільними тенденціями, що можна пояснити подібними фізико-хімічними властивостями досліджуваних лікарських речовин. Так, за ступенем вивільнення всіх діючих компонентів комбінованих супозиторіїв досліджувані основи можна розташувати у такій послідовності: вітепсол W35 > твердий жир > естерам > поліетиленоксидна основа.

Найбільший ступінь вивільнення всіх лікарських речовин спостерігався із вітепсолу W35, можливо, завдяки наявності у нього емульгуючих властивостей, які, як відомо, у багатьох випадках сприяють підвищенню швидкості вивільнення діючих речовин. Як рифампіцин, піразинамід, так і ізоніазид дуже повільно вивільнялися із поліетиленоксидної основи. У зв'язку з тим, що діалізічним середовищем в умовах проведеного дослідження була вода, повнота та швидкість вивільнення лікарських речовин залежала не тільки від ступеня розчинності діючих речовин у воді, а також від осмотичних властивостей супозиторних основ, з яких вони вивільнялися. Так, дуже незначне вивільнення всіх досліджуваних лікарських речовин із поліетиленоксидної основи можна пояснити тим, що зазначена основа має гіперосмолярні властивості, що перешкоджувало процесу дифузії лікарських речовин у воду.

Слід зауважити, що на початку проведення дослідження швидкість надходження у діалізічне середовище ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду була різною. Так, через 1 год при вивільненні із вітепсолу W35 у діалізаті реєструвалося 68 % ізоніазиду, 52 % піразинаміду та 28 % рифампіцину. Це можна пояснити різним ступенем розчинності лікарських речовин. Але всі діючі компоненти через 2-3 год досягали практично однакової максимальної концентрації (80-90 %) у діалізаті при вивільненні із вітепсолу W35, яка підтримувалася протягом останнього часу проведення експерименту. Аналогічний характер кривих вивільнення всіх діючих речовин комбінованих супозиторіїв є дуже важливою обставиною, так як спектр дії цих лікарських речовин різний, і тільки їх сумісна присутність в організмі у терапевтичних дозах може забезпечити ефективну дію на мікобактерії туберкульозу.

Таким чином, результати вивчення процесів вивільнення рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду із різних супозиторних основ свідчать, що гідрофобна супозиторна основа вітепсол W35 забезпечує спочатку швидко та повне, а далі поступове вивільнення всіх досліджуваних лікарських речовин, що відповідає фармако-терапевтичному призначенню розроблюваного препарату.

Швидкість і повнота вивільнення та всмоктування лікарських речовин, а також їх концентрація та час перебування в організмі у значній мірі залежать від розміру часток пре-

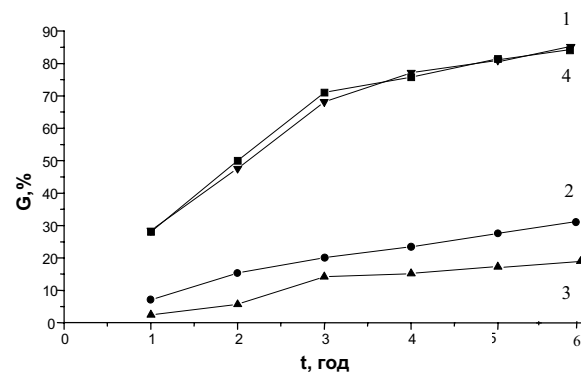
парату. Різниця у розмірі часток лікарської речовини може призвести до неоднакової швидкості її вивільнення та різної концентрації в біологічних рідинах і, внаслідок цього, до можливої терапевтичної нееквівалентності лікарських препаратів. Тому при створенні суспензійних препаратів доцільно регламентувати розмір часток лікарських речовин.

Ситовий аналіз лікарських речовин, що входять до складу комбінованих супозиторіїв, показав, що субстанції ізоніазид та піразинамід відносяться до найдрібніших порошоків і тому не потребують подальшого здрібнення, у той час як порошок рифампіцину має значний розмір кристалів. Тому порошок рифампіцину здрібнювали на барабанному млині типу 260.21/22 і просіювали крізь набір сит. Для дослідження були вибрані чотири фракції порошку: (500-710) мкм (нездрібнена); (180-250) мкм; (63-90) мкм та (45-63) мкм. Виготовляли зразки комбінованих супозиторіїв на основі вітепсолу W35 із різними фракціями рифампіцину. Вплив розміру часток рифампіцину на його вивільнення із супозиторіїв вивчали методом *in vitro* за вищезазначеною методикою.

На підставі одержаних результатів будували графіки залежності ступеня вивільнення рифампіцину із супозиторіїв від розміру його часток (Рис. 4).

Із результатів експерименту, представлених на Рис. 4, видно, що вивільнення рифампіцину зростає зі зменшенням розміру часток порошку субстанції. Максимальне вивільнен-

Рисунок 4



**Кінетика вивільнення рифампіцину із супозиторіїв із різним розміром часток лікарської речовини**

- 1. (45-63) мкм;
- 2. (180-250) мкм;
- 3. (500-710) мкм;
- 4. (63-90) мкм.

ня рифампіцину спостерігалось при використанні фракцій із розміром часток рифампіцину від 63 мкм до 90 мкм. Подальше подрібнення лікарської речовини практично не впливало на процес її вивільнення із супозиторіїв. Тобто експериментально було визначено порогове значення розміру часток лікарської речовини, після якого збільшення показника вивільнення рифампіцину не відбувається. Це дало підставу обґрунтувати використання рифампіцину з оптимальними розмірами часток і уникнути зайвого подрібнення лікарської речовини. Результати проведеного дослідження були враховані при розробці технології комбінованих супозиторіїв. У схемі виробничого процесу передбачена стадія здрібнення рифампіцину при приготуванні концентрату лікарських речовин та визначений їх режим завантаження.

На основі проведених досліджень запропоновано оптимальний склад комбінованих супозиторіїв для лікування туберкульозу.

#### Висновки

1. Експериментально в досліджах *in vitro* визначена залежність ступеня вивільнення лікарських речовин із комбінованих супозиторіїв від природи основ. Визначено, що гідрофобні основи сприяють швидкому та повному вивільненню із них досліджуваних лікарських речовин.

2. Встановлено, що оптимальним носієм лікарських речовин: рифампіцину, піразинаміду та ізоніазиду є вітепсол W35, який забезпечує одночасне максимальне та пролонговане вивільнення всіх діючих речовин, що відповідає фармакотерапевтичному призначенню розроблюваного препарату.

3. Встановлено залежність ступеня вивільнення рифампіцину від розміру його часток. Оптимальне вивільнення лікарської речовини із супозиторіїв спостерігалось при використанні рифампіцину із розміром часток (90-63) мкм.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Феценко Ю.И. Ситуация с туберкулезом в Украине // Доктор. — 2002. — № 4. — С. 11-16.
2. Петренко В.М. Лечение больных туберкулезом // Там же. — С. 25-28.

3. Феценко Ю.И., Мельник В.М., Матусевич В.Г. Характеристика стану захворюваності туберкульозом медичних працівників в Україні та світі // Український пульмонологічний журнал. — 2002. - № 1. — С. 20-22.

4. Феценко Ю.И. Вирішення основних терапевтичних проблем у фтизіопульмонології за допомогою лікарських засобів, зареєстрованих в Україні // Ліки. — 1995. - № 5. — С. 27-32.

5. Гризодуб А.И., Козлова Н.Г., Драник Л.И., Георгиевский В.П. и др. Стандартизация метода высвобождения *in vitro* биологически активных веществ из суппозиторий и мазей // Фармаком. — 1994. - № 12. — С. 4-20.

6. Гризодуб О.И., Козлова Н.Г., Драник Л.И., Георгиевский В.П. та ін. Стандартизація методу вивільнення *in vitro* лікарських речовин з супозиторіїв і мазей. 3. Стандартизована методика проведення вивільнення речовин // Вісник фармації. — 1997. - № 1. — С. 6-7.

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

8. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2002. - 2416 p.

#### Резюме

Романова Я.Ю.

#### Биофармацевтические исследования при создании нового комбинированного противотуберкулезного препарата в форме суппозиториев

Изучена зависимость кинетики высвобождения лекарственных веществ (изониазид, рифампицин, пиразинамид) из суппозиториев от типа основы. Изучено влияние размера частиц рифампицина на биофармацевтические свойства суппозиториев. На основе результатов проведенных исследований научно и экспериментально обоснован выбор суппозиторной основы и размера частиц лекарственного вещества при создании нового комбинированного противотуберкулезного препарата в форме суппозиториев.

#### Summary

Romanova Ya.Yu.

#### Biopharmaceutical studies during the creation of new combined anti-tuberculous product in suppository form

The dependence of kinetics of active substances (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide) release from suppositories on base type was studied. The impact of rifampicin particle size on biopharmaceutical properties of suppositories was studied. Basing on the results of studies conducted the choice of suppository base and active substance particle size during the creation of new combined anti-tuberculous product in suppository form was scientifically and experimentally founded.

**Романова Яна Юріївна.** Закінчила Українську фармацевтичну академію (УкрФА), магістратуру УкрФА (1998). Мол. наук. співр. сектору супозиторних лікарських форм ДП ДНЦЛЗ (2002).

УДК 615.216.2:615.456

Алмакаев М.С., Шевченко И.В., Алмакаева Л.Г., Будникова Т.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»  
ЗАО «Завод медицинского стекла Фарма-Пак», г. Киев

## Разработка комбинированного лекарственного средства для инъекций местноанестезирующего действия

Представлен ряд исследований по фармацевтической разработке нового комбинированного лекарственного средства Клокаин, раствор для инъекций. Определен состав и некоторые аспекты технологического процесса, которые являются критическими для воспроизводства серий препарата.

Решение проблемы сбалансированного поликомпонентного анестезиологического обеспечения продолжительных операций приводит к поиску новых, более эффективных, безопасных и экономичных методов анестезии.

Традиционно во время оперативных вмешательств продолжительностью 1.5 - 2 ч используют обезбоживание лидокаином в дозе 500-700 мг. Однако недостаточно выраженный моторный блок, вызываемый лидокаином, ограничивает выполнение хирургических вмешательств, что определяет необходимость либо значительного внутривенного потенцирования общими анестетиками или опиатами, либо дополнительного применения релаксантов с искусственной вентиляцией легких [1].

Методы местной анестезии и послеоперационной аналгезии постоянно совершенствуются. В течение последних десятилетий в анестезиологической практике необходимую цель достигают за счет сочетания многих лекарственных средств со специальными свойствами. Так, внимание анестезиологов обращено на использование препаратов класса  $\alpha$ -2-адреномиметиков, способных потенцировать обезболивающий эффект, а также снижать потребность в других анестетиках во время хирургического вмешательства. К таким препаратам относится клофелин (клонидина гидрохлорид) [2, 3, 4].

Комбинированное введение лидокаина гидрохлорида с клофелином исследовалось в Днепропетровской медицинской академии под руководством профессора Мамчура В.И. Была определена оптимальная терапевтическая доза лидокаина гидрохлорида в комбинации с клофелином: 400 мг и 200 мкг, соответственно, в 5 мл раствора, что легло в основу создания нового комбинированного лекарственного средства - клокаин. На способ лечения данной комбинацией лекарственных веществ получен патент Украины [1].

Особенности лидокаин-клофелин потенцирующей методики заключаются в следующем:

- уменьшается доза местного анестетика;
- исключается использование наркотического анальгетика;
- увеличивается продолжительность интра- и послеоперационного обезбоживания;
- усиливается степень релаксации операционного поля;
- снижаются дозы средств, необходимых для общего потенцирования;
- уменьшаются нежелательные эффекты эпидуральной анестезии.

Из вышеизложенного следует, что разработка комбинированного лекарственного средства на основе лидокаина гидрохлорида и клофелина в виде инъекционного раствора является актуальной задачей фармацевтической технологии и позволяет оптимизировать применение местных анестетиков.

Цель настоящей работы заключается в разработке состава, изучении стабильности и стандартизации технологии производства комбинированного препарата местноанестезирующего действия на основе лидокаина гидрохлорида и клофелина.

Объектами наших исследований были субстанции лидокаина гидрохлорид и клонидина гидрохлорид [5].

### *Результаты и их обсуждение*

Исследования по фармацевтической разработке нового лекарственного средства проводили согласно требований GMP путем установления состава и аспектов технологического процесса, которые являются критическими для воспроизводства серий препарата.

Для достижения поставленной цели исследовали фармако-технологические свойства активных субстанций лидокаина гидрохлорида и клонидина гидрохлорида, в том числе их физические характеристики и совместимость [6].

При изучении физических характеристик нами учитывалось влияние таких параметров, как растворимость указанных субстанций, содержание влаги и основного действующего вещества, наличие примесей, а также физические параметры приготовления инъекционной лекарственной формы. Следует отметить, что входящие в состав комбинированного лекарственного средства субстанции хорошо растворимы в воде. Это позволило определить температурный и временной режимы получения инъекционного раствора. Установлено, что растворение субстанций осуществляется при комнатной температуре в течение не менее 3-5 мин. Данные технологические параметры учтены при разработке технологической документации на лекарственное средство.

При создании комбинированного препарата исследовалось влияние одного из важнейших физических параметров - pH в установленных для состава пределах на стабильность активных ингредиентов. Так, известно, что водные растворы исходных субстанций имеют pH близкие по значению к интервалу от 4.0 до 5.5, что гарантирует их стабильность при совместном присутствии в составе комбинированной лекарственной формы. Были наработаны серии препарата с критическими интервалами pH, полученные добавлением 0.1 М раствора натрия гидроксида или 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной. Результаты исследований представлены в Табл. 1.

Таким образом, нами экспериментально подтверждены оптимальные значения pH

комбинированного препарата (от 4.0 до 5.5), что отражено в аналитической нормативной документации.

Одним из требований, предъявляемым к инъекционным препаратам, является отсутствие механических включений, видимых невооруженным глазом, которое достигается применением фильтрующих материалов [7, 8]. Для установления взаимного влияния препарата и фильтрующих материалов, которое может привести к изменению физико-химических свойств раствора, нами исследовались фильтрующие материалы, используемые в данное время на отечественных предприятиях-изготовителях фармацевтических препаратов: фильтрующие мембраны на основе эфиров целлюлозы, нейлона и капрона типа «Millipore», «Pall», «МИФИЛ». Результаты исследований представлены в Табл. 2.

Результаты исследований по совместимости клокаина с фильтрующими материалами показали, что изменений, связанных с ухудшением качества препарата, не наблюдалось, необходимая степень очистки от механических примесей достигалась, что будет в дальнейшем стандартизовано в технологическом регламенте.

Одним из основных требований к качеству парентеральных лекарственных средств является их стерильность, которая обеспечивается одним из технологических этапов производства инъекционных растворов — стерилизацией препарата в ампулах. Режимы стерилизации монопрепаратов на основе субстанций, входящих в состав разрабатываемого комбинированного препарата, значитель-

Таблица 1  
Зависимость показателей качества препарата Клокаин, раствор для инъекций, от pH среды после 9 мес хранения

pH препарата	Цветность	Прозрачность	Количественное содержание лидокаина г/х, г/мл	Количественное содержание клонидина г/х, мг/мл
4.0	бесцветный	прозрачный	0.0799	0.00401
5.0	бесцветный	прозрачный	0.0799	0.00400
5.5	бесцветный	прозрачный	0.0800	0.00401

Таблица 2  
Влияние различных фильтрующих материалов на некоторые показатели качества препарата Клокаин, раствор для инъекций

Материал фильтра	Прозрачность (по сравнению с водой)	Цветность	Механические включения	pH
эфир целлюлозы	прозрачный	бесцветный	отсутствуют	5.28
нейлон	прозрачный	бесцветный	отсутствуют	5.28
капрон	прозрачный	бесцветный	отсутствуют	5.28

но отличаются. Так, раствор лидокаина гидрохлорида стерилизуется при температуре 120 °С, раствор клофелина - при температуре 100 °С. Поэтому с целью обеспечения стерильности комбинированного инъекционного препарата были проведены исследования различных способов стерилизации ампул с раствором. При выборе оптимального способа стерилизации учитывались следующие моменты: способ стерилизации должен быть достаточно жестким для гарантированного достижения стерильности препарата и в то же время не вызывать деструкции компонентов и изменения физико-химических свойств раствора; он должен соответствовать требованиям Государственной Фармакопеи Украины [9]; кроме того должны учитываться производственные условия и соответствие способа стерилизации методам, применяемым в отечественной и зарубежной практике.

Исследовались термический метод с различными параметрами давления, температуры, времени стерилизации и метод стерилизующей фильтрации. Пригодность способов стерилизации контролировалась физико-химическими и микробиологическими методами. Результаты исследований по выбору способа стерилизации комбинированного лекарственного средства Клокаин, раствор для инъекций, представлены в Табл. 3.

При двух режимах термической стерилизации и стерилизующей фильтрации препарат был стерильным. Количественное содержание действующих веществ в исследуемых образцах препарата находилось в пределах требований нормативной документации. Нами определен оптимальный для данного препарата режим стерилизации, соответствующий требованиям ГФУ: стерилизация насыщенным паром при температуре 120 °С в течение 15 мин.

В качестве первичной упаковки комбинированного лекарственного средства Клокаин,

раствор для инъекций, использовали ампулы вместимостью 5 мл из стекла различных марок: УСП-1 (ОАО «Полтавский завод медицинского стекла»), НС-3 (ОАО «Курскмедстекло»), Schott Glass India (ЗАО «ФармаПак», г. Киев). В результате исследований при наблюдаемом сроке (9 мес.) установлено, что препарат соответствует требованиям.

*Выводы*

1. На основе лидокаина гидрохлорида и клонидина гидрохлорида, исходя из технологических свойств субстанций, разработаны состав и технология приготовления комбинированного лекарственного средства Клокаин, раствор для инъекций.

2. На данном этапе исследований определен ряд критических факторов, которые в дальнейшем будут использованы для валидации технологического процесса. Выбраны оптимальные температурный и временной режимы получения раствора, оптимальные пределы рН среды, изучено взаимное влияние фильтрующих материалов и лекарственного средства, определен оптимальный режим стерилизации препарата, соответствующий требованиям ГФУ.

3. Проводимые исследования показывают перспективность дальнейшего изучения стабильности препарата и разработки научно-технической документации, необходимой для внедрения в промышленное производство и медицинскую практику комбинированного местноанестезирующего лекарственного средства Клокаин, раствор для инъекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 46525 А Україна, А 61Р23/00,23/02. Комбінований місцевознезбочуючий засіб / Мамчур В.Й., Забашний С.І., Коваленко О.Ю., Алмакаєва Л.Г. (Україна). - 8 с.  
 2. Виноградов В.Л., Ларионов И.Ю. Клофелин в схеме внутривенной анестезии при операциях у тяжелобольных // Анестезиология и реаниматология. - 2002. - № 3. - С. 49-52.  
 3. Ambrose C., Sale S., Howells R. et al. Intravenous clonidine infusion in critically ill children: dose-dependent

Таблица 3

**Влияние режимов стерилизации на качество исследуемого препарата**

Режим стерилизации	Цветность раствора		Прозрачность раствора		рН раствора	
	до стерилизации	после стерилизации	до стерилизации	после стерилизации	до стерилизации	после стерилизации
температура 120 °С, время 15 мин	бесцветный	бесцветный	прозрачный	прозрачный	4.47	4.47
температура 100 °С, время 30 мин	бесцветный	бесцветный	прозрачный	прозрачный	4.47	4.47
стерилизующая фильтрация	бесцветный	бесцветный	прозрачный	прозрачный	4.47	4.47

sedative effects and cardiovascular stability // Br. J. Anaesth. — 2000. — Vol. 84, No. 6. - P. 794-796.

4. De Deyne, Straus M., Heylen R. et al. Influence of intravenous clonidine pretreatment on anesthetic requirements during bispectral EEG-guided sevoflurane anesthesia // J. Clin. Anesth. — 2000. — Vol. 12, No.1. - P. 52-57.

5. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - Strasburg: Council of Europe, 1997 (Suppl. 2002). - CD-ROM Version. - P. 948, 1471.

6. 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. - Киев: МОРИОН, 2001. - 472 с.

7. Інструкція «Контроль лікарських засобів для парентерального застосування на механічні включення»: КД 42У-001-93. — Київ, 1993. - 16 с.

8. Т. Брок. Мембранная фильтрация: Пер. с англ. - М.: Мир, 1987. - 462 с.

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

#### Резюме

Алмакаєв М.С., Шевченко І.В., Алмакаєва Л.Г., Буднікова Т.М.

#### Розробка комбінованого лікарського засобу для ін'єкцій місцевоанестезуючої дії

Представлено ряд досліджень із фармацевтичної розробки нового комбінованого лікарського засобу Клокаїн, розчин для ін'єкцій. Визначено склад та деякі аспекти технологічного процесу, що є критичними для відтворюваності серій препарату.

#### Summary

Almakayev M.S., Shevchenko I.V., Almakayeva L.G., Budnikova T.N.

#### Development of the combined injection medicinal agent with topical anesthetic effect

A series of investigations on the pharmaceutical development of Clocaïne, a new injection medicinal agent is presented. The composition and some aspects of technological process being critical ones for reproducibility of the drug batches have been determined.

**Алмакаєв Максим Сергеевич** (р. 1980). Окончил Национальный фармацевтический университет (2002). Инженер лаборатории инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств.

**Шевченко Ирина Васильевна.** Окончила Харьковский государственный фармацевтический институт (1981). Ст. науч. сотр. лаборатории инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств. К.фарм.н (2002).

**Алмакаєва Людмила Григорьевна.** Окончила Харьковский политехнический институт (1983). Зав. лаб. инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств (1996). К.фарм.н. (1995). Член редакционного совета Государственной Фармакопеи Украины.

**Буднікова Татьяна Николаевна.** Окончила Харьковский государственный фармацевтический институт (1981). Директор ЗАО «Завод медицинского стекла Фарма-Пак». Д.фарм.н.

УДК 615.211:615.456

Бегунова Н.В., Алмакаєва Л.Г.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

### Разработка состава и технологии инфузионного препарата кардиотонического действия на основе солей кислоты аспарагиновой

Определен состав и разработана технология приготовления инфузионного раствора калия и магния аспарагината, основанная на процессе получения солей из исходных реагентов. Определены оптимальные технологические параметры солеобразования и приготовления раствора препарата. Выявлена пригодность используемой фармацевтическими предприятиями Украины первичной упаковки (бутылок, пробок) для производства препарата «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий».

Одним из современных направлений фармацевтической практики является использование в качестве лекарственных субстанций аминокислот и их производных.

Аминокислоты играют важную роль в современной фармакологии, поскольку они, являясь структурными элементами белков и других эндогенных соединений, имеют большое функциональное значение. Препараты этой группы природных биоактивных веществ отличаются высокой фармакологической активностью, проявляют весьма низкую токсичность и минимальное побочное действие на организм.

Известны лекарственные препараты на основе кислоты аспарагиновой, обладающие антиаритмическим действием. Хорошо зарекомендовали себя и широко используются в качестве лекарственных средств при лечении сердечно-сосудистых заболеваний калиевые и магниевые соли кислоты аспарагиновой. Их применяют при аритмиях сердца, обусловленных, главным образом, электролитными нарушениями, в первую очередь, гипокалиемией [1-4].

Предполагают, что аспарагинат-ион в данном случае является переносчиком ионов калия и магния и способствует их проникнове-



нию во внутриклеточное пространство. Поступая в клетки, аспарагинат включается в процессы метаболизма. Ионы магния способствуют усилению терапевтического эффекта препаратов [1, 2].

Арсенал зарегистрированных в нашей стране лекарственных средств на основе солей кислоты аспарагиновой представлен отечественными и зарубежными препаратами. В Украине 4 предприятия выпускают Аспаркам в форме таблеток и 3 предприятия — инъекционный раствор Аспаркама в ампулах по 5 мл, 10 мл и 20 мл. Импортируемые препараты представлены таблетками, покрытыми полипленочной оболочкой «Панангин», и одноименным раствором для инъекций в ампулах по 10 мл производства фирмы «Gedeon Richter», Венгрия.

Парентеральное (внутривенное) использование препарата предполагает капельный и струйный путь введения. Перед использованием содержимое одной или нескольких ампул разводят в растворе глюкозы 5 % или воде для инъекций, что требует приобретения стерильных растворов для разведения. Проведение дополнительных манипуляций повышает риск возникновения побочных эффектов [1].

За рубежом кроме инъекционной лекарственной формы в ампулах выпускаются инфузионные растворы калия и магния аспарагината, не требующие разведения перед применением. Известны препараты «Трофикард» (фирма «Кехлер», Германия), «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий» (фирмы «Берлин-Хеми» и «Клинтек» (Германия)) [5].

В Украине эти препараты не зарегистрированы и в настоящее время не закупаются. Поэтому для терапии сердечно-сосудистых заболеваний актуальным является пополнение ассортимента лекарственных средств препаратом, готовым для внутривенного капельного введения.

Целью настоящей работы является разработка состава и технологии производства отечественного инфузионного лекарственного средства - аналога немецкого препарата «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий» в бутылках по 500 мл, применение которого позволит оптимизировать терапию сердечно-сосудистых заболеваний.

#### *Материалы и методы исследований*

Объектами исследования были исходные реагенты для получения солей калия и магния

аспарагинатов: калия гидроксид, магния оксид и DL-аспарагиновая кислота. В качестве вспомогательного вещества использован D-сорбит.

Изучались физико-химические характеристики указанных веществ и условия протекания реакций солеобразования калия и магния аспарагинатов для определения оптимальных технологических параметров приготовления раствора: температурного режима, технологических пределов pH, порядка введения исходных веществ.

В качестве первичной упаковки для инфузионного раствора калия и магния аспарагината использовались бутылки стеклянные для крови, трансфузионных и инфузионных препаратов из стекла марки НС-2 и МТО и пробки из резиновой смеси марки 52-369/1 на основе бутилкаучука и силиконовые марки ИР-21.

В ходе осуществлявшихся научно-исследовательских работ проводился качественный и количественный контроль образцов препарата. В качестве показателей, характеризующих стабильность лекарственного средства, исследовали органолептические показатели (прозрачность, цветность), механические включения, pH раствора, содержание действующих веществ и допустимых примесей, стерильность, апиrogenность.

Апробация конечных результатов лабораторных исследований проводилась в условиях промышленного производства.

#### *Результаты и их обсуждение*

Препарат «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий» представляет собой водный раствор калиевой и магниевой солей кислоты аспарагиновой. За основу разрабатываемой лекарственной формы было принято содержание в ней ионов калия и магния в терапевтической концентрации: для калия — 58.5 ммоль/л, для магния — 27.7 ммоль/л. Концентрация калия аспарагината и магния аспарагината в препарате составляют 10.02 г/л и 7.99 г/л, соответственно.

В Украине, как и в других странах СНГ, отсутствует производство необходимых лекарственных субстанций — солей калия и магния аспарагинатов, но выпускается в промышленных масштабах D,L-аспарагиновая кислота. Поэтому при разработке технологии приготовления раствора был использован предложенный ранее способ получения этих солей в растворе. Способ заключается в совмещении операций получения и перевода в

раствор калия и магния аспарагинатов путем проведения реакции нейтрализации D,L-аспарагиновой кислоты калия гидроксидом и магния оксидом при повышенной температуре в водной среде [6-8].

С учетом стехиометрических коэффициентов реакций солеобразования были рассчитаны количества ингредиентов, необходимые для получения моносолой калия аспарагината и магния аспарагината указанных концентраций. Для получения 1 л раствора необходимо 3.283 г калия гидроксида, 1.116 г магния оксида, 15.16 г кислоты аспарагиновой.

В результате изучения физико-химических характеристик используемых веществ, в частности субстанции калия гидроксида, было установлено, что при получении калия аспарагината по достижении установленных пределов значений pH водного раствора соли заданной концентрации необходимо осуществлять дополнительный контроль вводимого количества этого компонента. Это обусловлено высокой гигроскопичностью и трудно стандартизуемым содержанием основного вещества в субстанции калия гидроксида (не менее 85 %).

Для оптимизации процесса получения калиевой соли было предложено при приготовлении раствора использовать калия гидроксид в виде водного раствора с определенной концентрацией (20-30 %), что позволяет исключить элемент случайности, обусловленный высокой гигроскопичностью субстанции калия гидроксида. Этот технологический прием оказался возможным применить для инфузионной лекарственной формы. Так как концентрация иона калия в растворе для инфузий ниже, чем в растворе для инъекций в 4.5 раза, то и объем раствора щелочи, добавляемой в реактор, меньше; не требуется использование дополнительного более сложно-

го емкостного оборудования и коммуникаций для работы с ним.

Технологические пределы pH, обеспечивающие получение продукта с заданными параметрами по содержанию основного вещества, были определены обработкой данных количественного анализа модельных смесей с критическими значениями концентраций калиевой соли кислоты аспарагиновой. Зависимость количественного содержания калий-иона от pH раствора представлена в Табл. 1.

Из данных таблицы видно, что оптимум pH раствора для инфузий находится в пределах 6.0-7.4, что несколько шире, чем для инъекционного раствора.

При pH ниже 6.0 кислая среда раствора способствует осаждению из раствора малорастворимой кислоты аспарагиновой (0.5 г в 100 мл воды). С другой стороны, при высоких значениях pH возможно образование малорастворимого гидроксида магния (0.642 мг в 100 мл воды). Поскольку в инфузионном растворе калия и магния аспарагината концентрация ионов магния в 5 раз ниже, чем в инъекционном растворе Аспаркам, возможность образования видимой взвеси магния гидроксида уменьшается. Это дало возможность повысить верхнее значение интервала pH среды от 7.0 до 7.4. Стабильность образцов раствора, имеющих pH от 7.0 до 7.4, подтверждена его показателями качества при хранении в течение регламентированного срока.

С учетом физико-химических характеристик используемых веществ и условий протекания реакций солеобразования калия и магния аспарагинатов были определены оптимальные технологические параметры приготовления раствора. Для проведения реакции образования магния аспарагината необходима повышенная температура раствора, а реакция образования калия аспарагината со-

Таблица 1

**Зависимость количественного содержания калий-иона от pH раствора**

Концентрация калия гидроксида, г/л	Прозрачность раствора	pH	Количественное содержание K <sup>+</sup> , г/л*
2.9	взвесь	5.80	2.048
3.1	прозрачен	6.01	2.060
3.2	прозрачен	6.33	2.224
3.3	прозрачен	6.62	2.288
3.4	прозрачен	6.85	2.290
3.5	прозрачен	6.99	2.375
3.6	прозрачен	7.38	2.508
3.7	прозрачен	7.65	2.523

\* в соответствии с АНД количественное содержание калий-иона в препарате составляет (2.059 - 2.517) мг/мл

проводается повышением температуры реакционной смеси, т.е. первая реакция является эндотермической, вторая – экзотермической. С учетом этих особенностей отработан температурный режим проведения нейтрализации.

При выборе порядка введения исходных веществ учитывалось влияние избытка одноименных компонентов (кислоты аспарагиновой) на смещение равновесия в сторону образования продуктов реакции. При приготовлении ампулированного инъекционного раствора «Аспаркам» загрузку кислоты аспарагиновой предпочтительно вести в два этапа для последовательного получения солей. Ее концентрация (74.0 г/л) значительно превышает растворимость (5 г/л), что приводит к подавлению диссоциации кислоты и замедлению скорости реакции нейтрализации, а, следовательно, к увеличению длительности процесса и деструктивному влиянию избыточного температурного воздействия. Количество кислоты аспарагиновой для приготовления инфузионного раствора калия и магния аспа-

рагината (15.16 г на 1 л раствора) в 5 раз меньше, чем для приготовления раствора для инъекций, поэтому оказалось возможным проводить ее загрузку одномоментно, что сокращает время приготовления.

В первую очередь проводят реакцию образования магния аспарагината для предотвращения образования побочного продукта - малорастворимого магния гидроксида ( $K_A = 2.5 \cdot 10^{-3}$ ), который может образовываться при совместном проведении реакций солеобразования калия и магния аспарагината. После её завершения проводят получение калия аспарагината. Введение в раствор избыточного количества гидроксильных ионов предотвращают, добавляя последние порции калия гидроксида при контроле величины рН, значение которого должно быть в интервале 6.5-6.7.

В качестве антикоагулянта и энергетического компонента в состав препарата входит D-сорбит в концентрации 0.11 моль/л (20 г/л).

Одним из необходимых условий создания новых лекарственных форм является изуче-

Таблица 2

**Результаты исследования стабильности раствора калия и магния аспарагината в бутылках при хранении**

Показатели качества	Стекло НС-2		Стекло МТО	
	пробка 52-369/1	пробка ИР-21	пробка 52-369/1	пробка ИР-21
<b>прозрачность:</b> исходные данные	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
1 год	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
2 года	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
<b>цветность:</b> исходные данные	не интенсивнее эталона $Y_7$	не интенсивнее эталона $Y_7$	не интенсивнее эталона $Y_7$	не интенсивнее эталона $Y_7$
1 год	то же	то же	то же	то же
2 года	то же	то же	то же	то же
<b>запах:</b> исходные данные	без запаха	без запаха	без запаха	без запаха
1 год	специфич. запах	без запаха	специфич. запах	без запаха
2 года	специфич. запах	без запаха	специфич. запах	без запаха
<b>механические включения:</b> исходные данные	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
1 год	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
2 года	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
<b>рН:</b> исходные данные	6.50	6.50	6.50	6.50
1 год	6.45	6.41	6.47	6.39
2 года	6.45	6.37	6.45	6.38
<b>количественное содержание:</b> исходные данные	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД
1 год	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД
2 года	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД	соотв. АНД

ние влияния физико-химических свойств первичной упаковки на показатели качества лекарственного препарата. «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий» производства фирмы «Берлин-Хеми» выпускается в стеклянных бутылках, укупоренных пробкой, и в полиэтиленовых бутылках с заваренной головкой.

Стекло бутылки не индифферентно к растворам, ингредиенты которых могут взаимодействовать со стеклом, вызывая разрушение последнего и переход его составных частей в жидкую фазу. Деструкция внутреннего слоя стекла может также вызвать образование механических включений, отсутствие которых в инфузионных растворах строго регламентируется [9]. Нами были проведены исследования стабильности препарата, помещенного в бутылки стеклянные, выпускаемые в Украине.

На стабильность растворов влияет также физико-химическая стойкость укупорочных средств (пробок), зависящая от состава резины и от технологии их производства. Заводами Украины используются пробки из резиновой смеси марки 52-369/1 и пробки силиконовые марки ИР-21, которыми и укупорены бутылки с образцами препарата для исследования влияния первичной упаковки на его показатели качества. Результаты исследований представлены в Табл. 2.

В результате проведенных исследований установлено, что все использованные материалы пригодны в качестве первичной упаковки для препарата «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий». Оба вида стекла не вызывали ухудшения физико-химических показателей раствора, выходящих за пределы, регламентированные АНД. При использовании пробок марки 52-369/1 на основе бутылкаучука при хранении появляется специфический запах, обусловленный разложением тиурама, что частично можно предотвратить специальной предварительной обработкой пробок и силиконированием. В бутылках, укупоренных пробками марки ИР-21, запаха не обнаруживается, однако рН раствора снижается на несколько большую величину, чем при укупорке пробками резиновыми марки 52-369/1. В обоих случаях отклонение этого показателя незначительно и соответствует интервалам, указанным в АНД.

#### Выводы

1. Разработан состав отечественного инфузионного препарата «Раствор калия и маг-

ния аспарагината» - кардиотонического средства, при внутривенном капельном введении которого быстро достигается терапевтическая концентрация калия и магния в плазме и обеспечивается длительное их пребывание в кровеносном русле.

2. Предложенная оригинальная технология получения солей калия и магния аспарагината из исходных реагентов непосредственно в растворе позволяет значительно снизить технические затраты на их производство и получить препарат, доступный широкому кругу потребителей.

3. Определены оптимальные технологические параметры приготовления раствора для инфузий и исследована стабильность препарата при его хранении в первичной упаковке.

4. Технология препарата сердечно-сосудистого действия «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий» внедрена в промышленное производство, что позволит улучшить медикаментозное обеспечение населения Украины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. - 13-е изд., новое. - Харьков: Торсинг, 1997. - Т. 2. - 592 с.
2. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заика М.У., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. - Киев: Здоровье, 1982. - 200 с.
3. Алиев Х.У., Хакимов Д.А. Антиаритмическое действие некоторых комплексных соединений магния в эксперименте // Анализ, синтез и фармакологическое изучение некоторых физиологически активных веществ: Тр. I Ташк. гос. мед. ин-та. - Ташкент, 1991. - С. 21-25.
4. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. - М.: Мир, 1985. - 456 с.
5. Rote Liste. - Frankfurt/Main: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. (BPI), 1996.
6. Пат. 14452 Україна, 51А 61К 31/195. Спосіб отримання ін'єкційного засобу «Аспаркам», що має антиаритмічну активність / Затула Є.І., Науменок Л.Г., Шевченко І.В., Бегунова Н.В., Новік І.І. та ін. - 3 с.
7. Алмакаева Л.Г., Бегунова Н.В. Способы получения калиевой и магниевой солей аспарагиновой кислоты в производстве инъекционных препаратов // Запорожский медицинский журнал. - 2004. - Т.2, № 1(22). - С. 66-68.
8. Алмакаева Л.Г., Бегунова Н.В., Затула Є.І. Вітчизняні кардіологічні препарати - аспарагинати калію та магнію, розчини для ін'єкцій та інфузій // Фармацевтичний журнал. - № 5. - 2002. - С. 77-81.
9. Технология лекарственных форм / Под. ред. Л.А. Ивановой. - М.: Медицина, 1991. - Т.2. - 544 с.

#### Резюме

Бегунова Н.В., Алмакаева Л.Г.

#### Розробка складу та технології інфузійного препарату кардіотонічної дії на основі солей кислоти аспарагінової

Визначено склад та розроблено технологію приготування інфузійного розчину калію та магнію аспарагинату, що основана на процесі одержання солей із ви-

хідних реагентів. Визначено оптимальні технологічні параметри солеутворення та приготування розчину препарату. Виявлено придатність первинної упаковки, що застосовується фармацевтичними підприємствами України, для виробництва препарату «Калію та магнію аспарагінат, розчин для інфузій».

#### Summary

Begunova N.B., Almakayeva L.G.

#### Development of composition and technology of cardiostimulant infusion drug on the basis of aspartic acid salts

The composition of Potassium Magnesium Aspartate infusion solution was determined and technology of that one based on the salts manufacture from starting reagents was developed. The optimal process variables of salt formation and preparation of the drug solution were determined. The suitability of primary package (bottles, clo-

tures) used in Ukrainian pharmaceutical plants for manufacture of Potassium Magnesium Aspartate infusion solution was established.

**Бегунова Наталья Власовна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1986). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1986). Науч. сотр. лаборатории инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств.

**Алмакаева Людмила Григорьевна.** Окончила Харьковский политехнический институт (1983). Зав. лаб. инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств (1996). К.фарм.н. (1995). Член редакционного совета Государственной Фармакопеи Украины.

УДК 615.276:615.454.2

Довга І.М.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

### Дослідження впливу деяких фармацевтичних факторів на вивільнення парацетамолу із супозиторіїв

Вивчено стійкість супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г, 0.17 г та 0.33 г на різних основах до руйнування. Показано, що стійкість супозиторіїв із парацетамолом до руйнування залежить від вмісту лікарської речовини, а також від типу основи. Досліджено вплив природи основи, її ефірного числа, вмісту лікарської речовини, здатності супозиторіїв до розстилання, типу ПАР та розміру часток парацетамолу на його вивільнення із супозиторіїв *in vitro*. Показано, що найбільш повне вивільнення лікарської речовини відбувається із супозиторіїв із парацетамолом на основі вітепсолу W35 із розміром часток лікарської речовини (45-63) мкм. Результати досліджень використані при розробці оптимального складу супозиторіїв із парацетамолом різного дозування.

Для одержання необхідного терапевтичного ефекту препарату у формі супозиторіїв важливе значення має основа, що застосовується для виготовлення супозиторіїв, її фізико-хімічні показники, вибір ПАР, розмір часток лікарської речовини та ін. [1-3].

Однією із суттєвих характеристик, що визначають фармако-терапевтичну дію супозиторіїв, є швидкість та повнота вивільнення з них лікарських речовин. У фармацевтичній практиці існує значна кількість методів *in vivo* та *in vitro* для вивчення кінетики вивільнення діючих речовин із лікарської форми [4].

При розробці складу супозиторіїв для вибору основи, розміру часток та інших фармацевтичних факторів часто використовують методи *in vitro*, що імітують умови вивільнення лікарських речовин із препарату або дифузії крізь спеціально підібрані штучні ліпідні мембрани. Це особливо важливо для мало розчинних лікарських речовин [4, 5].

Метою даної роботи було вивчення впливу природи основи, її ефірного числа, вмісту лікарської речовини, здатності супозиторіїв до розстилання, допоміжних речовин та розміру часток лікарської речовини на вивіль-

нення парацетамолу різного дозування із супозиторіїв для розробки їх оптимального складу та прогнозування необхідного терапевтичного ефекту.

#### Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження були супозиторії анальгетичної та жарознижуючої дії з парацетамолом 0.08 г, 0.17 г та 0.33 г для дітей.

Для приготування супозиторіїв із парацетамолом використали різні за своєю природою основи: гідрофільні - композиції ПЕО 1500 та ПЕО 400 у співвідношенні 90:10 та 80:20; ліпофільні - твердий жир, вітепсол W35, вітепсол H15, естерам H35, масло какао.

Як поверхнево-активні речовини (ПАР) використали аніонний та неіоногенний емульгатори 1 та 2 роду - емульгатор № 1 та емульгатор Т-2.

Парацетамол вводили в основу по типу суспензії (подрібнений порошок змішували з частиною основи).

Виготовлені зразки випробовували на стійкість супозиторіїв до руйнування за методикою Європейської Фармакопеї [6, 7].

Таблиця 1

Стійкість супозиторіїв із парацетамолом різного дозування до руйнування

Склад основи	Стійкість супозиторіїв до руйнування, г		
	0.08 г	0.17 г	0.33 г
твердий жир	2600	2800	3000
вітепсол Н15	більше 5000	більше 5000	більше 5000
вітепсол W35	більше 5000	більше 5000	більше 5000
естерам Н35	більше 5000	більше 5000	більше 5000
масло какао	1200	1300	1400
ПЕО 1500:ПЕО 400 (90:10)	4200	4300	4400
ПЕО 1500:ПЕО 400 (80:20)	1400	1500	1600

Для відібраних зразків вивчали швидкість вивільнення парацетамолу. Вивчення швидкості вивільнення парацетамолу із супозиторіїв, приготованих на різних основах та з додаванням ПАР, проводили мембранно-дифузійним методом [8]. Кількісне визначення парацетамолу при вивільненні проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 247 нм. Ефірне число основ, що досліджувалися, визначали за методикою Державної Фармакопеї України [9].

Випробування на здатність супозиторіїв до розстигання проводили за методикою Угорської Фармакопеї [10].

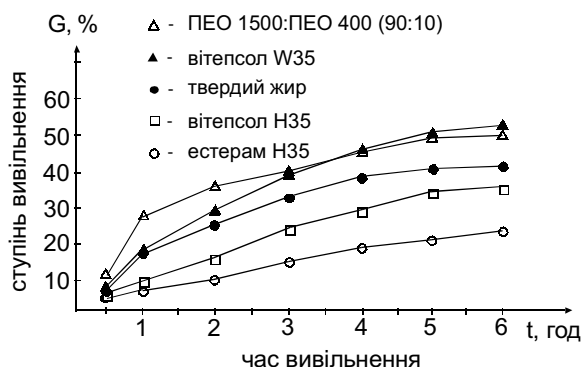
Визначення розміру часток парацетамолу проводили за допомогою ситового аналізу за методикою Державної Фармакопеї України [9].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження стійкості супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г, 0.17 г та 0.33 г на різних основах до руйнування наведені в Табл. 1.

Результати експерименту показали, що супозиторії з парацетамолом на основах твер-

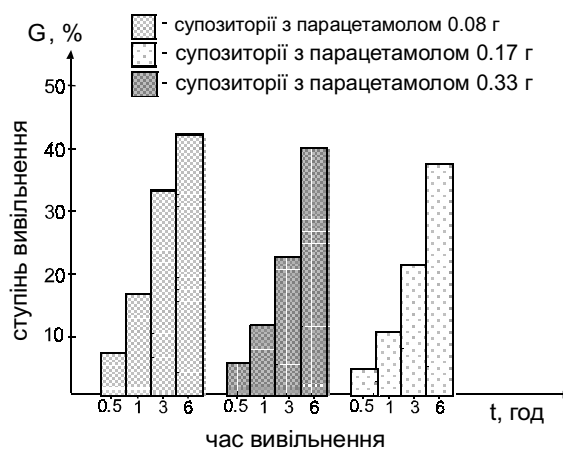
Рисунок 1



Кінетика вивільнення парацетамолу з різних основ (для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г)

дого жиру, вітепсолу W35, вітепсолу Н15, естераму Н35 та композиції ПЕО 1500 та ПЕО 400 у співвідношенні 80:20 витримують навантаження більше 2600 г. Зі збільшенням вмісту діючої речовини стійкість супозиторіїв до руйнування збільшується. Для супозиторіїв із парацетамолом, приготованих на основі твердого жиру, стійкість супозиторіїв до руйнування зі зростанням вмісту лікарської речовини від 0.08 г до 0.33 г збільшується на 400 г. Аналогічна залежність одержана для супозиторіїв із парацетамолом на основах масла какао та композиції поліетиленоксидів різної молекулярної маси. Для супозиторіїв із парацетамолом на основах вітепсолу Н15, вітепсолу W35 та естераму Н35 ця залежність не простежується, так як супозиторії витримують досить велике навантаження (більше 5000 г). Супозиторії з парацетамолом на основі поліетиленоксидів різної молекулярної маси у співвідношенні 80:20 і масла какао мають мінімальне значення стійкості до руйну-

Рисунок 2



Залежність вивільнення парацетамолу з основи твердого жиру від вмісту діючої речовини у супозиторії

вання (1200-1600) г, що може призвести до втрати їхньої форми [7]. Тому дані основи у подальших дослідженнях не використовувалися.

Результати досліджень із вивільнення парацетамолу 0.08 г із ряду основ, що досліджуються, представлені на Рис. 1.

Із рисунка видно, що природа основи значною мірою впливає на швидкість і повноту вивільнення парацетамолу із супозиторіїв. Для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г найбільш швидко вивільнення парацетамолу на початку експерименту спостерігали з гідрофільної поліетиленоксидної основи (12.3 %). Через 3 год проведення експерименту концентрація парацетамолу, вивільненого з основи вітепсолу W 35, сягає концентрації лікарської речовини, вивільненої з поліетиленоксидної основи (39.2 %). До завершення експерименту вона сягає 53.1 %, що перевищує кількість вивільненого парацетамолу у порівнянні з гідрофільною основою на 3 %. Із супозиторних основ твердого жиру, вітепсолу Н15 та естераму Н35 протягом 6 год парацетамолу вивільнилося 42.4 %, 36.3 % та 23.1 %, відповідно.

Аналогічні результати одержані для вивільнення парацетамолу з випробовуваних

основ для супозиторіїв із парацетамолом 0.17 г та 0.33 г.

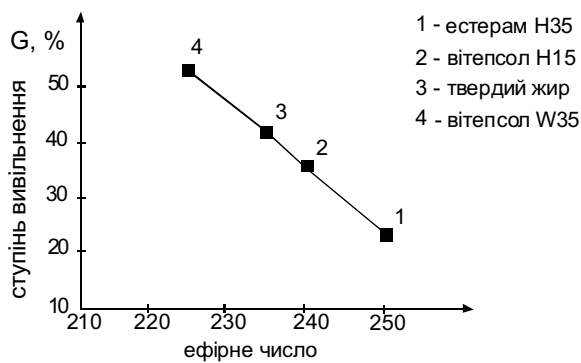
За кількістю вивільненої лікарської речовини із супозиторних основ можна побудувати такий ряд: вітепсол W35 > ПЕО > твердий жир > вітепсол Н15 > естерам Н35.

Із одержаних даних видно, що на вивільнення парацетамолу із супозиторіїв впливає не тільки природа основи, але й кількість лікарської речовини. Чим менше парацетамолу входить до складу супозиторію, тим повніше вивільнення діючої речовини (Рис. 2).

Для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г, 0.17 г і 0.33 г, виготовлених на основі твердого жиру, кількість лікарської речовини, що пройшла крізь напівпроникну мембрану у діалізат протягом 6 год, складала 42.4 %, 40.5 % та 38.1 %, відповідно. Аналогічна залежність простежується для супозиторіїв із парацетамолом різного дозування на інших основах. Незначне зменшення вивільнення лікарської речовини із супозиторних основ при збільшенні концентрації парацетамолу можна пояснити збільшенням в'язкості та температури плавлення супозиторіїв.

За результатами експерименту найбільш повне вивільнення парацетамолу різного дозування з основ, що досліджуються, показав

Рисунок 3



Залежність вивільнення парацетамолу від ефірного числа основи (для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г)

Рисунок 4



Залежність вивільнення парацетамолу від здатності до розстигання супозиторіїв на різних основах (для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г)

Таблиця 2

Показники здатності супозиторіїв із парацетамолом різного дозування до розстигання

Склад основи	Здатність супозиторіїв із парацетамолом до розстигання, %		
	0.08 г	0.17 г	0.33 г
твердий жир	43.0	41.2	40.3
вітепсол W35	47.2	45.3	44.6
вітепсол Н15	40.0	38.5	37.6
естерам Н35	36.8	35.9	35.5

ли вітепсол W35 та поліетиленоксидна основи. Однак враховуючи, що поліетиленоксидні основи виявляють високу осмотичну активність та мають дегідратуючу властивість, через що можлива незначна подразнююча дія на слизову оболонку, у подальших дослідженнях перевагу віддали основі вітепсолу W35.

Відомо, що в деяких випадках на повноту вивільнення лікарської речовини із супозиторіїв впливає ефірне число супозиторних основ та здатність супозиторіїв до розстилання [10, 11].

Для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г нами вивчалася залежність ступеня вивільнення парацетамолу від ефірного числа основ, що досліджуються (Рис. 3).

Із рисунка видно, що кількість вивільненого парацетамолу із супозиторіїв, приготованих на різних ліпофільних основах, знаходиться у зворотній залежності від ефірного числа основ. Це можна пояснити тим, що ліпофільні основи з більш високим значенням ефірного числа поглинають меншу кількість води, тому вивільнення активної речовини при дифузії крізь напівпроникну мембрану уповільнено. Найбільш повне вивільнення парацетамолу (53.1 %) спостерігали із супозиторіїв, виготовлених на основі вітепсолу W35.

Результати дослідження здатності до розстилання супозиторіїв із парацетамолом різного дозування, виготовлених на ліпофільних основах, представлені в Табл. 2.

Із таблиці видно, що найбільш повну здатність до розстилання мають супозиторії на основі вітепсолу W35. Зі збільшенням концентрації діючої речовини в супозиторії зменшується його здатність до розстилання.

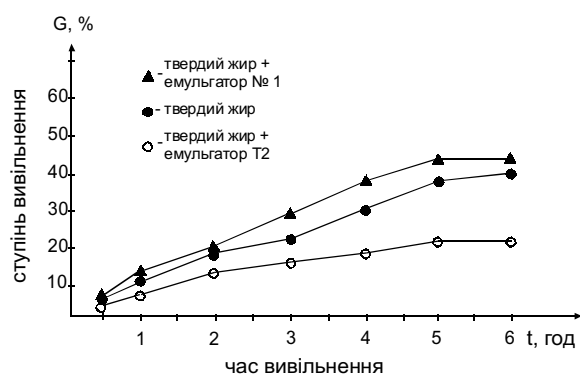
Експериментально вивчалася залежність вивільнення лікарської речовини з ліпофільних супозиторних основ від здатності супозиторіїв до розстилання. На Рис. 4 представлені результати дослідження для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г.

Із рисунка видно, що зі збільшенням здатності супозиторіїв, що досліджуються, до розстилання, зростає кількість вивільненої з них активної речовини. Так, при збільшенні здатності супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г до розстилання в 1.28 рази швидкість дифузії лікарської речовини зростає у 2.3 рази.

При розробці складу супозиторіїв із парацетамолом також було вивчено вплив деяких ПАР на вивільнення лікарської речовини із супозиторних основ. Різні типи ПАР у кількості 5 % вводили в основу твердого жиру. Кількісне визначення парацетамолу при вивільненні проводили спектрофотометричним методом. Результати досліджень наведені на Рис. 5.

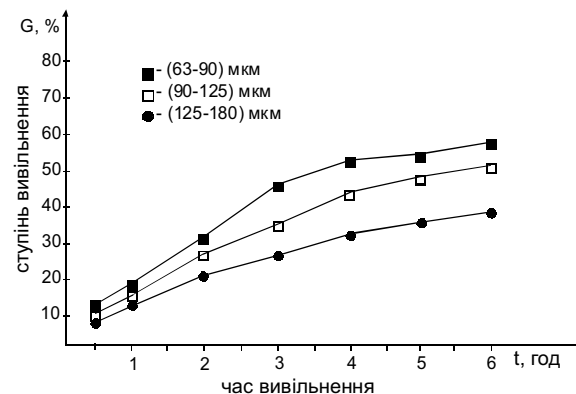
Результати експерименту свідчать, що введення емульгаторів в основу твердого жиру для супозиторіїв із парацетамолом 0.17 г порізно впливає на вивільнення лікарської речовини. Протягом експерименту емульгатор № 1 збільшував швидкість вивільнення парацетамолу порівняно з основою твердого жиру без додавання ПАР у 1.1 рази, емульгатор Т-2 зменшував швидкість вивільнення лікарської речовини в 1.9 разів. Емульгатор № 1 збільшував швидкість вивільнення парацетамолу з основи твердого жиру, але концентрація вивільненої діючої речовини не досягає рівня вивільнення парацетамолу з основи вітепсолу W35. Із супозиторіїв із парацетамолом 0.17 г на основі твердого жиру з

Рисунок 5



**Вплив ПАР на вивільнення парацетамолу з основи твердого жиру (для супозиторіїв із парацетамолом 0.17 г)**

Рисунок 6



**Вплив розміру часток на вивільнення парацетамолу з основи вітепсолу W35 (для супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г)**



емульгатором № 1 протягом 6 год вивільнилося 44.2 % лікарської речовини, а на основі вітепсолу W35 — 49.5 %.

Швидкість та повнота вивільнення лікарської речовини, введеної в лікарську форму у вигляді порошку, значною мірою зумовлена розміром його часток [12, 13]. У зв'язку з цим нами була вивчена залежність вивільнення парацетамолу із супозиторіїв, що містять діючу речовину у вигляді порошку з різним розміром часток (Рис. 6).

Із рисунка видно, що вивільнення парацетамолу із супозиторіїв на основі вітепсолу W35 знаходиться у певній залежності від розміру часток. Із зменшенням розміру часток порошку від (90-125) мкм до (63-90) мкм спостерігається збільшення кількості лікарської речовини, що вивільняється, у 2.5 рази протягом 6 год. Подальше зменшення розміру часток парацетамолу до (45-63) мкм призвело до незначного збільшення вивільнення лікарської речовини із супозиторіїв. Це можна пояснити тим, що із зменшенням розміру часток парацетамолу збільшується його поверхнева енергія, виникає додатковий енергетичний бар'єр, який знижує проникність лікарської речовини крізь мембрану. Результати проведених досліджень показали, що найбільш повне вивільнення парацетамолу спостерігається із супозиторіїв, що містять діючу речовину із розміром часток (45-63) мкм.

Таким чином встановлено, що швидкість вивільнення парацетамолу із супозиторіїв, приготованих на різних основах, залежить від типу основи, її ефірного числа, здатності супозиторіїв до розстилання і вмісту лікарської речовини. Найбільш повне вивільнення лікарської речовини відбувається із супозиторіїв на основі вітепсолу W35 із розміром часток (45-63) мкм.

#### Висновки

1. Вивчено стійкість супозиторіїв із парацетамолом різного дозування до руйнування. Показано, що досліджувані основи мають необхідну стійкість до руйнування.

2. Методом *in vitro* проведено порівняльне вивчення кінетики вивільнення парацетамолу із різних за своєю природою основ. Показано, що найбільш швидке вивільнення лікарської речовини забезпечує основа вітепсолу W35.

3. Вивчено вплив типу ПАР на швидкість вивільнення парацетамолу із супозиторіїв. Показано, що введення емульгаторів в основу твердого жиру по-різному впливає на

швидкість вивільнення парацетамолу із супозиторіїв.

4. Досліджено вплив розміру часток парацетамолу на його вивільнення із супозиторіїв. Показано, що найбільш повне вивільнення парацетамолу спостерігається із супозиторіїв на основі вітепсолу W35 із розміром часток лікарської речовини (45-63) мкм.

Результати досліджень використані при розробці складу супозиторіїв із парацетамолом 0.08 г, 0.17 г та 0.33 г для дітей.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Тенцова А.И., Бузовский А.Н. Сравнительное исследование жировых основ для детских суппозиториях // Труды ВНИИ фармации. - М: Медицина, 1977. - Т. XV. - С. 127-133.
2. Постольник В.В., Перцев И.М. Состав та властивості нової супозиторної основи // Вісник фармації. - 2002. - № 2 (30). - С. 84-86.
3. Козлова Н.Г., Долгая И.Н., Замараева Е.Е., Пятикоп А.Б., Романова Я.Ю. Суппозитории для применения в педиатрии // Вісник фармації. - 2002. - № 2 (30). - С.105-106.
4. Тенцова А.И., Ажгихин И.С. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств (Введение в биофармацию). - М.: Медицина, 1974. - 336 с.
5. Безуглая Е.П., Фадейкина А.Г., Лысокобылка А.А. и др. Исследование высвобождения некоторых лекарственных веществ из различных основ для мазей и суппозиториях // Фармаком. - 1999. - № 1. - С. 26-29.
6. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - Strasbourg: Council of Europe, 2002. - 2416 p.
7. Ляпунов Н.А., Столпер Ю.М. Фармако-технологический тест «Устойчивость суппозиториях и пессариев к разрушению» при фармацевтической разработке, производстве и контроле качества готовых лекарственных средств // Фармаком. - 2002. - № 3. - С. 22-27.
8. Гризодуб А.И., Козлова Н.Г., Драник Л.И., Георгиевский В.П. и др. Стандартизация метода высвобождения *in vitro* биологически активных веществ из суппозиториях и мазей // Фармаком. - 1994. - № 12. - С. 4-20.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - 556 с.
10. Orosz Szela Maria, Regdon Geza, Redgon Geza. Szulfadimidinnatrium tartalmazo vegbelkupo fizikai parameterei es in vitro gyogyszerleadasa // Gyogyszereszet. - 1979. - Vol. 23, No. 12. - P. 454-458.
11. Korbár-Smid J., Kristl J., Szcic S. Einfluß des Spreitmögens der Suppositorienmasse auf die Wirkstofffreisetzung // Sci. pharm. - 1986. - Bd. 54, H. 2. - S. 87-92.
12. Тенцова А.И., Сергеев В.В., Гарбузова А.Л. и др. Влияние степени дисперсности лекарственных веществ на их биологическую доступность // Фармация. - 1977. - Т. 26. - № 4. - С. 12-14.
13. Бондаренко А.И. К вопросу о степени дисперсности лекарственных веществ в фармацевтических суспензиях // Фармация. - 1982. - № 4. - С. 27-30.

#### Резюме

Долгая И.Н.

#### Исследование влияния некоторых фармацевтических факторов на высвобождение парацетамолу из суппозиториях

Изучена устойчивость суппозиториях с парацетамолом 0.08 г, 0.17 г и 0.33 г на различных основах к разрушению. Показано, что устойчивость суппозиториях к

разрушению зависит от содержания лекарственного вещества, а также от типа основы. Исследовано влияние природы основы, ее эфирного числа, содержания лекарственного вещества, способности суппозитория к расстиланию, типа ПАВ и размера частиц парацетамола на его высвобождение из суппозитория *in vitro*. Показано, что наиболее полное высвобождение лекарственного вещества из суппозитория с парацетамолом происходит из суппозитория на основе витепсола W35 с размером частиц лекарственного вещества (45–63) мкм. Результаты исследований использованы при разработке оптимального состава суппозитория с парацетамолом различных дозировок.

Summary

Dolgaya I.N.

#### Studying of influence of some pharmaceutical factors on release of paracetamol from suppositories

The rapture resistance of suppositories with 0.08 g, 0.17 g and 0.33 g paracetamol was studied. It was shown

that the rapture resistance of suppositories with paracetamol depends on active substance content and also on a type of base. The impact of base character, its ester value, active substance content, ability of suppositories for spreading, surfactant type and particle size of paracetamol on active substance release from suppositories *in vitro* were studied. It was shown that the most complete active substance release occurred from suppositories with paracetamol on Witepsol W35 base with active substances particle size (45–63) mm. The results of the study were used when developing optimal composition of suppositories with different paracetamol dosage.

**Довга Інна Миколаївна.** Закінчила Харківський державний університет (1982). Наук. співр. сектору супозиторних лікарських форм ДП ДНЦЛЗ (від 1993).

УДК 615.453.6.011.

Бондаренко О.В., Казаринов Н.А., Пашнева Р.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

### Разработка технологии получения препарата в форме капсул на основе валерианы

Исследованы физико-химические свойства гидрофильного комплекса валерианы. Изучено влияние вспомогательных веществ на гранулометрический состав массы для наполнения капсул. Выбран оптимальный состав и разработана технология получения капсул на основе гидрофильного комплекса валерианы.

Глобальное и прогрессирующее ухудшение состояния окружающей среды, особенно в Украине, усиление негативного экологического пресса на человека, рост темпов жизни стали в последнее время закономерными и неотвратимыми [1]. Ослабленный экологией, стрессами и болезнями организм с разноплановыми метаболическими и регуляторными нарушениями не в состоянии выдержать полимедикаментозное давление синтетическими лекарственными средствами [2]. Поэтому создание высокоэффективных препаратов растительного происхождения с целью повышения эффективности проводимого лечения и снижения его себестоимости остается актуальной проблемой отечественной фармацевтической промышленности.

Достижения современной фармацевтической химии, биологии, клинической и экспериментальной медицины сформировали новые взгляды на терапевтические возможности, которые предоставляет использование лекарственных растений, их биологически активных веществ.

Многие известные в народной медицине целебные растения, их действие на организм человека до сих пор не полностью исследова-

ны современными методами, лекарственное растительное сырье не стандартизовано, не разработаны четкие терапевтические показания [3]. Это касается и валерианы.

Настойки и экстракты валерианы применяются как в моно-, так и в комбинированных препаратах — смесях с другими настойками, экстрактами и отдельными веществами (кардиовален, валоседан, капли Зеленина, капли ландышево-валериановые с адонизидом и др.) [4, 5]. Известны и широко применяются препараты зарубежного производства: вальман, балдриседон (Германия), седовал (Болгария) и др., отечественного производства — таблетки и драже из экстракта валерианы густого [5, 6]. За рубежом создан ряд препаратов на основе эфирных масел и валепотриатов в виде капсул, капель, мазей и др. [7, 8].

Валериану применяют при функциональных хронических расстройствах центральной нервной системы, неврозах, истерии, бессоннице, мигрени, хронических нарушениях коронарного кровообращения, болях в области сердца функционального характера, тахикардии и экстрасистолии, связанных с невротическим состоянием коры головного мозга. Используют ее также при спазмах пи-

щевода, особенно его кардинального отдела, болях в желудке спастического характера, нарушениях секреторной деятельности желудочно-кишечного тракта. За рубежом наряду с известным действием препаратов валерианы выявлены еще и гепатозащитный, антибактериальный, противовирусный, противоопухолевый, иммуномоделирующий эффекты [9, 10, 11].

В ГП ГНЦАС разработан новый препарат седативного действия на основе гидрофильного комплекса валерианы (ГКВ) в форме твердых желатиновых капсул.

Одним из важных преимуществ твердых желатиновых капсул является возможность их заполнения сыпучими порошками или смесями порошков. Это не только упрощает технологический процесс, но и позволяет избежать нежелательного для некоторых веществ воздействия неблагоприятных технологических факторов, что в ряде случаев является существенным.

Разработка современных технологических приемов, которые позволяют капсулировать лекарственные субстанции с разнообразными физико-химическими характеристиками, способствует существенному расширению номенклатуры препаратов в форме капсул [12].

Сегодня препараты в форме желатиновых капсул присутствуют в номенклатуре почти всех фармакологических групп.

Из более чем 4100 торговых наименований лекарственных препаратов, представленных на украинском и российском фармацевтических рынках, 425 (10.4 %) находится в форме капсул [13, 14].

Желатиновые капсулы, как относительно новая лекарственная форма, благодаря ряду преимуществ и техническому прогрессу (выпуск высокопродуктивных и высокоточных автоматических установок по изготовлению и наполнению капсул), начиная с 50-х годов прошлого столетия приобретают все боль-

шую популярность, которая объясняется также высокими медико-фармацевтическими и производственными характеристиками: высокой биодоступностью, стабильностью, коррегирующей способностью, точностью дозирования, высокой производительностью, эстетичностью внешнего вида, щадящими технологическими режимами.

Целью наших исследований явилась разработка состава и технологии лекарственного препарата в форме твердых желатиновых капсул из гидрофильного комплекса валерианы.

Физико-химические свойства ГКВ представлены в Табл. 1.

Агрегатное состояние ГКВ, обладающего текучестью, свойственной густым экстрактам, потребовало применения таких вспомогательных веществ, при которых достигается сумма свойств, необходимых для получения лекарственной формы в виде твердых желатиновых капсул: оптимальных показателей текучести гранул, насыпного объема, уплотняемости, обеспечивающих, в конечном итоге, точность дозирования лекарственного вещества.

С этой целью были исследованы следующие вспомогательные вещества: целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ) (фирма «Pharmaceutical & Chemical Corporation», Англия), крахмал картофельный (фирма «Amylum Nederland B.V. P. O. Vox», Нидерланды), аэросил (Калушский ОЭЗ ИХП НАН Украины), сахар молочный (ОСТ 49-63-85, Львовский молокозавод, Украина), кальция гидрофосфат (фирма «СРС Wolfgang Muhlbauer GmbH», Германия).

Проведенные исследования показали, что комбинация действующего вещества — ГКВ в количестве 0.05 г (в пересчете на сухое вещество) с одним из вспомогательных веществ: сахаром молочным, крахмалом картофельным или кальция гидрофосфатом не позволила получить препарат в виде капсул при-

Таблица 1

**Физико-химические свойства гидрофильного комплекса валерианы**

Серия ГКВ	Влагосодержание, %	Внешний вид	Содержание органических кислот, % (не менее 18 %)	Содержание аминокислот, % (не менее 0.8 %)
16.03.01	18.20	густая масса бурого-коричневого цвета	18.35	5.70
21.03.01	19.30	- // -	22.10	3.35
28.03.01	20.50	- // -	21.50	4.76
04.04.01	18.36	- // -	19.80	5.28
10.04.01	19.50	- // -	20.72	4.15

Таблица 2

Экспериментальные данные по установлению оптимального содержания крахмала картофельного в массе для капсулирования

Содержание крахмала картофельного, %	Влагосодержание, %	Характеристика влажной массы для капсулирования
30	4.5	масса не технологична, гранулирование невозможно
40	3.7	масса не гранулируется, наблюдается залипание на сетке
50	4.2	масса гранулируется плохо, наблюдается залипание на сетке
60	5.1	масса гранулируется, гранулы не качественные (рассыпаются)
70	4.2	масса гранулируется, гранулы рассыпаются
80	4.5	масса сухая, гранулы отсутствуют

емлемого размера, так как для перевода ГКВ из жидкой формы в твердую необходимо значительное количество каждого из этих веществ.

Более приемлемым наполнителем явился крахмал картофельный, подсушенный до влагосодержания 3-5 %.

Исследовались составы масс для капсулирования с содержанием крахмала картофельного от 30 % до 80 % с остаточным влагосодержанием 3-5 % и содержанием влаги в ГКВ в пределах (18-20) %. Результаты представлены в Табл. 2.

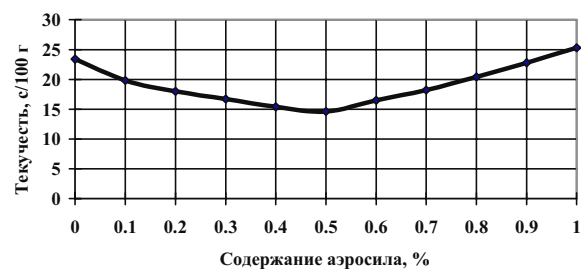
Из Табл.2 видно, что оптимальным содержанием наполнителя в лекарственной форме является (60-70) % крахмала картофельного. Однако полученные гранулы не достаточно прочные, поэтому дальнейшие исследования были направлены на повышение этого показателя.

Был исследован ряд прописей, где в качестве вспомогательного вещества, улучшающего прочность гранул, была использована МКЦ в количестве (10-20) % в сочетании с крахмалом картофельным до получения массы содержимого капсул 0.2 г.

Исследования показали, что введение в состав массы для капсулирования 10 % МКЦ позволяет получить достаточно прочные гранулы, исключив при этом операцию сушки крахмала картофельного.

Учитывая тот факт, что гранулы, полученные на основе растительных экстрактов, гигроскопичны, в состав разрабатываемой лекарственной формы было введено вещество с влагорегулирующими свойствами — аэросил, который, имея большую удельную поверхность и однородность частиц сферической формы, в оптимальном количестве обеспечивает текучесть гранулята. Необходимое количество аэросила было определено экспериментальным путем. Результаты исследования представлены на Рис. 1.

Рисунок 1



#### Зависимость текучести массы для капсулирования от содержания аэросила

Из Рис. 1 видно, что при увеличении содержания аэросила в массе для капсулирования до 0.5 % текучесть массы возрастает, а затем начинает медленно снижаться. Следовательно, оптимальным в массе для капсулирования является содержание 0.5 % аэросила.

Технология получения препарата заключается в следующем: ГКВ смешивали с крахмалом картофельным и МКЦ до образования влажной комкающейся при сжатии в руке массы. Далее массу подвергали влажному гранулированию через сито с размером отверстий 2 мм и сушили в сушильном шкафу при температуре (50-60) °С до остаточного влагосодержания массы не более 3 %. Сухую грануляцию проводили через сито с размером отверстий 1.2 мм и опудривали аэросилом. Текучесть полученных гранул составила (20-25) с/100 г.

Таким образом, на основании проведенных исследований предложен состав и технология производства оригинального препарата в форме капсул «Валевигран» с минимальным содержанием вспомогательных веществ. Изучение специфической активности разработанных капсул, проведенное сотрудниками лаборатории экспериментальной фармакологии ГП ГНЦЛС, в сравнении с таблетками из экстракта валерианы показало, что препарат оказывает характерное для валерианы седа-

тивное действие, превосходя по активности промышленный образец тотального экстракта по отдельным тестам в 1.5-2 раза. При этом препарат оказывает вегетотропное действие при невротических состояниях с системными нарушениями сердечно-сосудистой системы, проявляет снотворный эффект, улучшая качество сна и значительно его удлиняя, потенцирует действие снотворных и седативных средств.

#### Выводы

Проведенные исследования позволили выбрать оптимальный состав и технологию получения нового оригинального препарата — капсулы «Валевигран». Оформлены материалы заявки на изобретение.

Препарат прошел клинические испытания и планируется ко внедрению на ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод» в 2004 году.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сердюк А.М., Чернобыль и здоровье населения Украины // Довкілля та здоров'я. — 1998. - №2 (5). — С. 30-35.
2. Толстой М. І. Проблеми розвитку регіональних зон України // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. — 2002. - №2 — С. 7-9.
3. Haag R. Die Arzneimittel und ihre Quellen // Mensch und Medicament // Munchen-Zurich, 1993. — S. 17-28.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. — М.: Медицина, 2000. — Т. 1 - С. 88-89.
5. Регистр лекарственных средств России / Под ред. Ю.Ф. Крылова. — М.: Инфармхим, 1993. - 1006 с.
6. Коновалова О. А., Рыбалко К.С. Биологически активные вещества подземных органов *Valeriana L.* // Растительные ресурсы. - 1991. - Т. 27. - Вып.1. - С. 146-159.
7. Фурса Н.С., Литвиненко В.И., Пакалн Д.А. и др. Валепотриати - перспективна група природних біологічно активних сполук видів родини валеріанових. 1. Виділення, класифікація, якісне та кількісне визначення // Фармац. журн. — 1982. - № 6. - С. 38-43.
8. Фурса Н.С., Литвиненко В.И., Пакалн Д.А. и др. Валепотриати - перспективна група природних біологічно активних сполук видів родини валеріанових. 2. Біо-генез, фармакологічна дія, перспективи використання // Там же. — 1983. - № 3. - С. 27-30.
9. Балицкий К.П., Воронцов А.А. Лекарственные растения и рак. — К.: Наукова думка, 1982. — 376 с.
10. Кисліченко В.С. Дослідження фізіологічно активних сполук роду *Ribes L.* // Фізіологічно активні речовини. — 1999. - №1 (27). — С. 105-107.
11. British Pharmacopoeia 1998. — HMSO, 1998. — Vol. 1, 2.
12. Технология и стандартизация лекарственных средств: Сб. науч. тр. — Харьков: ИГ "РИРЕГ", 2000. — Т. 2. - С. 448-449.
13. Лекарственные препараты в России: Справочник Видаль. — М.: АстраФармСервис, 2000.
14. Фарминдекс-97: Лекарственные препараты. — Киев, 1997.

#### Резюме

Бондаренко О.В., Казарінов М.О., Пашнева Р.О.

#### Розробка технології одержання препарату у формі капсул на основі валеріани

Досліджено фізико-хімічні властивості гідрофільного комплексу валеріани. Вивчено вплив допоміжних речовин на гранулометричний склад маси для наповнювання капсул. Обрано оптимальний склад та розроблено технологію одержання капсул на основі гідрофільного комплексу валеріани.

#### Summary

Bondarenko O.V., Kazarinov N.A., Pashneva P.A.

#### Development of manufacturing technology of product in capsule form on the basis of valerian

The physicochemical properties of valerian hydrophilic complex were investigated. The effect of excipients on granulometric composition of mass for capsules filling was studied. The optimal composition and the production technology of capsules manufacturing on the basis of valerian hydrophilic complex were selected.

**Бондаренко Оксана Владимировна.** Мл. науч. сотр. лаборатории таблетированных лекарственных средств ГП ГНЦЛС.

**Казаринов Николай Александрович** (р.1937). Окончил фармацевтический факультет 1-го Московского медицинского института. Работает в ГП ГНЦЛС (с 1959). Д.фарм.н. (1989). Профессор (1993). Чл.-корр. Инженерной академии Украины (1992). Зав. лабораторией таблетированных лекарственных средств ГП ГНЦЛС.

**Пашнева Раиса Александровна.** К.фарм.н. Ст. науч. сотр. лаборатории таблетированных лекарственных средств ГП ГНЦЛС.

УДК 577.152.311:547.587.51:547.814.5:582.736

Янченко П.С.

Национальный фармацевтический университет

## Липазотропная активность субстанции пифламин и выделенных из нее индивидуальных веществ фенольной природы

Впервые определена способность субстанции пифламин, выделенной из травы *Pissum sativum* L., влиять на панкреатическую липазу. Из субстанции выделено 11 веществ кумариновой и фенольной природы: скополетин, эскулетин, эскулин, кемпферол, лютеолин, кверцетин, никотифлорин, изокверцитрин, кверцетин-3-О-софорозид, рутин и астрагалозид. Астрагалозид выделен из пифламина впервые. Исследована липазотропная активность субстанции пифламин (активатор) и выделенных веществ: эскулетина, эскулина, кемпферола, лютеолина, кверцетина, никотифлорина, астрагалозида. Показана перспективность исследования пифламина как активатора панкреатической липазы.

Исследования в области поиска веществ, обладающих липазотропной активностью, получают всё большее распространение во всём мире. Это связано, прежде всего, с высокой практической актуальностью такого поиска. Ингибиторы липаз перспективны для лечения и профилактики ожирения, лечения гиперлипидемических состояний, приводящих к атеросклерозу и т.д. [1]. Безопасные и эффективные активаторы липолиза интересны как компоненты новых высокоэффективных препаратов для заместительной терапии энзимной недостаточности [2].

Исследования липазотропной активности экстрактов растительного сырья и фитопрепаратов также становятся всё более актуальными. Так, получены данные об ингибирующем влиянии на панкреатическую липазу водного экстракта из корневища *Alpinia officinarum* и выделенных из него 3-метокси-5,7-дигидроксифлавона [3] и 5-гидрокси-7-(4'-гидрокси-3'-метоксифенил)-1-фенил-3-гептана [4], липофильного комплекса из семян рапса ярового [5] и др. Интересно исследование ингибирующих свойств спирто-водных экстрактов традиционных препаратов восточной медицины Daio-Orengedokuto и Orengedokuto (смеси radix *Scutellariae*, rhizoma *Coptidis*, cortex *Phellodendri*, fructus *Gardenie*, rhizome *Rhei*, последний только для Daio-Orengedokuto) [6]. Ранее нами была исследована активирующая активность силибора, гепатопротектора из семян *Silibum maculatum* [2]. Всё это доказывает актуальность поиска липазотропных агентов растительного происхождения.

Целью данного исследования является определение липазотропной активности гепатопротекторного препарата из травы *Pissum sativum* L. — пифламина и индивидуальных соединений  $\alpha$ - и  $\gamma$ -бензопирановой природы,

которые были выделены нами из данной субстанции.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлась субстанция пифламин, предоставленная производителем - ГП «ОЗ ГНЦЛС», соответствующая АНД к РП № Р.1003/07520.

Определение липазотропной активности проводили аналогично [2], методом рН-статирования в собственной модификации, который заключается в непрерывном поддержании определённого значения рН в среде липолитической реакции в течение заданного времени с помощью титрованного раствора натрия гидроксида; при этом активность липазы прямо пропорциональна расходу титранта. Для статистической обработки использовали методы, рекомендованные в [7].

Пифламин вводили в среду липолитической реакции в концентрации 1 мг/мл и 0.33 мг/мл, индивидуальные вещества вводили в концентрации 0.1 мг/мл. Концентрация модельного фермента — 0.5 мг/мл.

В качестве модельного фермента использовали панкреатин (Pancreatin from hog pancreas, «Fluka», кат. № 76190, номинальная активность не менее 8 ЛЕ/мг). В качестве субстрата — оливковое масло фармакопейного достоинства.

Для выделения веществ субстанцию растворяли в дистиллированной воде, полученный раствор последовательно обрабатывали хлороформом с 3 % спирта, этилацетатом и н-бутанолом. Полученные фракции упаривали и остатки разделяли методом колоночной хроматографии на различных сорбентах.

Для разделения суммы веществ хлороформно-этанольной фракции сухой остаток фракции растворяли в хлороформно-этанольной смеси, высушивали и наносили на колонку силикагеля с 5 % гипса. Работу ко-

лонки контролировали с помощью хроматографии на бумаге. Колонку элюировали хлороформом с 5 % спирта. Выделено два вещества I и II.

Для разделения суммы веществ этилацетатной фракции сухой остаток фракции смешивали с силикагелем и наносили на колонку из смеси силикагеля и 5 % гипса. Колонку промывали этилацетатом, контролируя состав фракций хроматографией. Были получены вещества III, IV, V, VI.

Для разделения суммы веществ н-бутанольной фракции сухой остаток н-бутанольного извлечения растворяли в этаноле и смешивали с силикагелем с последующим высушиванием. Сухую смесь наносили на подготовленную колонку из силикагеля с 5 % гипса. Колонку промывали бензол – н-толуольной смесью (9:1, 8.5:1.5 и 8:2), контролируя состав фракций хроматографией. В результате были получены вещества VII, VIII и IX.

Идентификацию выделенных веществ проводили путём сравнения их физико-химических свойств со свойствами достоверных образцов. Для определения температуры плавления использовали прибор «Buchi Melting Point B-545» (Швейцария), ИК-спектры снимали на приборе «Nicolet Avatar 320 IR» (США), УФ-спектры – на спектрофотометре «Hewlett Packard HP 8452», элементный анализ проводили на автоматическом анализаторе «C-N-N Hewlett Packard M-185» (США).

#### *Результаты и их обсуждение*

Выделенные и идентифицированные индивидуальные вещества субстанции пифламин представлены в Таблице.

Таким образом, используя методы дробной экстракции и хроматографического разделения веществ на колонках удалось выделить из субстанции пифламин 3 вещества кумариновой (1 гликозид) и 8 веществ флавоноидной природы (5 гликозидов).

Результаты определения липазотропной активности субстанции пифламин и выделенных веществ в течение 3 мин, 5 мин, 7 мин и 10 мин проведения липолитической реакции представлены на Рисунке.

Из рисунка видно, что пифламин и большинство выделенных из него веществ в условиях эксперимента обладают активирующей активностью. По результатам статистической обработки следует признать недостоверным влияние кверцетина после 7 мин, лютеолина до 5 мин, остальные точки достоверны относительно объединённой выборки контроля

( $n_k = 64; 72; 52; 76$  (соотв. 3 мин, 5 мин, 7 мин, 10 мин),  $n_o = 3$  (для всех точек),  $P = 99\%$ ). Следует отметить, что для большинства исследуемых индивидуальных веществ наблюдается рост активизирующего влияния на первых минутах реакции (до 5 – 7 минуты) с дальнейшим уменьшением влияния, что может быть обусловлено частичным разложением веществ или их гидролизом, изменением свойств поверхности раздела фаз в результате накопления продуктов реакции липолиза с последующим изменением межфазового распределения веществ, конкуренцией с продуктами реакции или иными причинами, которые предполагаются к дальнейшему изучению.

Таким образом, можно предположить, что установленный активирующий эффект пифламина обусловлен сложной суммой эффектов фенольных соединений данной субстанции. Роль каждого компонента в данном влиянии и характер суммы влияний при совместном присутствии, а также более точное установление качественного и количественного состава препарата и влияния на липазу отдельных неустановленных компонентов являются перспективными направлениями исследования. Можно предположить сложный механизм данного воздействия, очевидно смешанного типа, что мы предполагаем для дальнейшего исследования.

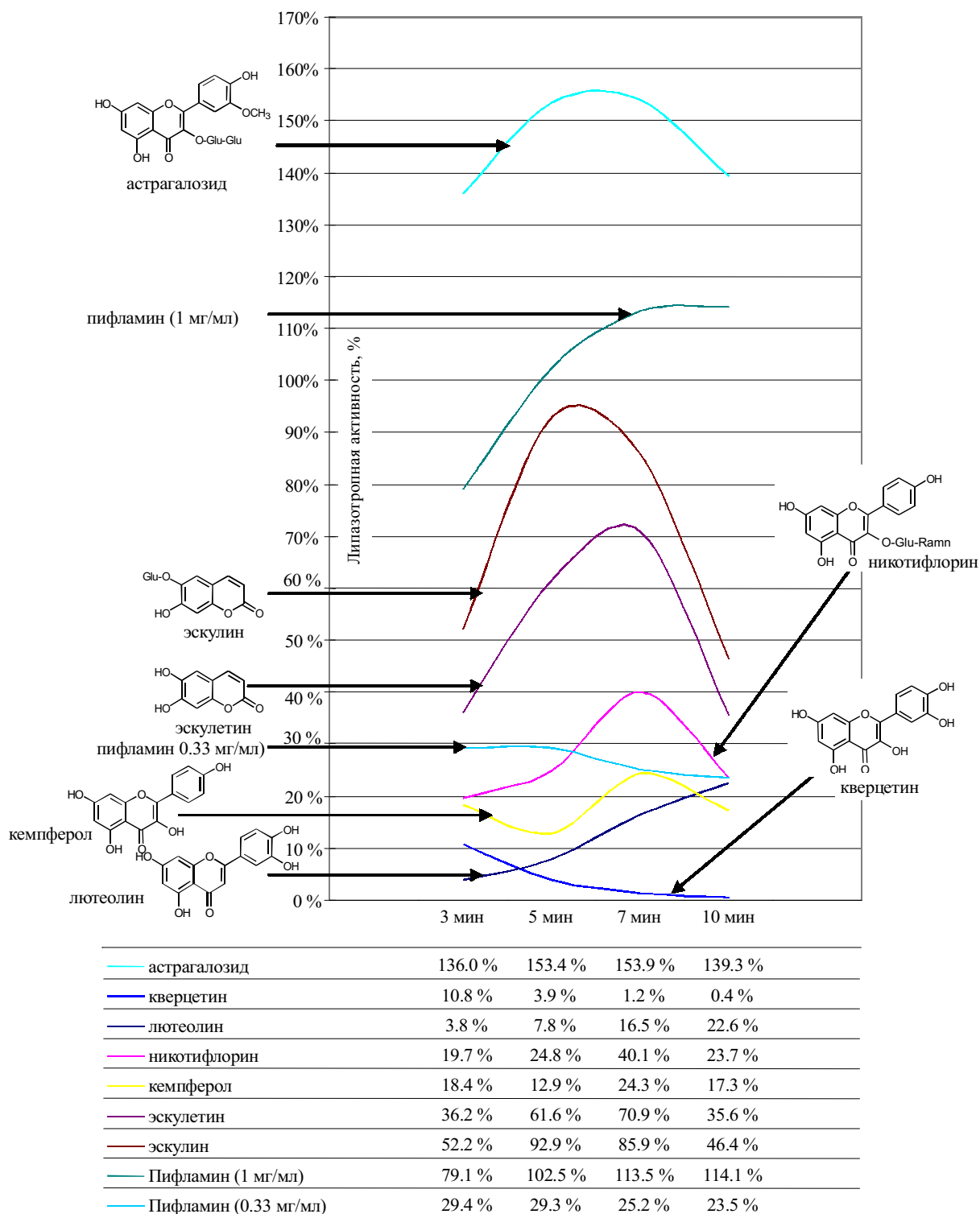
#### *Выводы*

Впервые показано активирующее воздействие пифламина на панкреатическую липазу. Из субстанции пифламин выделено и идентифицировано 11 индивидуальных веществ кумаринового и флавоноидного ряда (впервые выделен астрагалозид). 7 входящих в состав пифламина веществ проверено на липазотропную активность. Впервые установлен активирующий эффект данных соединений. Показана перспективность исследования субстанции пифламин как активатора панкреатической липазы.

#### *ЛИТЕРАТУРА*

1. Пат. 5540917 США, МКИ<sup>6</sup> А 61 К 31/74. Biomass lipase inhibitor useful for treating adiposity / Isler D., Rehm W., Widmer E. (Швейцария); Hoffman-La Roche Inc. - № 447164; Заявл. 19.05.1995; Опубл. 30.07.1996. – 5 с.
2. Янченко П.С., Пашнев П.П., Казаринов Н.А., Комисаренко А.Н. Исследование липазотропной активности силибора // Фармаком. – 2003. – № 1. – С. 75 – 77.
3. Ji-Eun Shin, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* Inhibits Pancreatic Lipase // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26, No. 6. – P. 854–857.

Рисунок



Липазотропная активность субстанции пифламин и выделенных из нее веществ



Таблица

Идентифицированные вещества, выделенные из субстанции пифламин

Код	Вещество идентифицировано как	Брутто-формула	Т.пл. (°С)	Оптическое вращение	Методы идентификации*
<i>Кумарины</i>					
I	скополетин (6-метокси-7-гидроксикумарин)	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	200 – 202	-	- данные элементного состава; - УФ-спектр (96 % этанол – 230 нм, 255 нм, 291 нм, 345 нм, после добавления этилата натрия – bathochromный сдвиг – 239 нм, 395 нм); - ИК-спектр (3350 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппа), 2986 см <sup>-1</sup> , 2844 см <sup>-1</sup> (оксиметильная группа), характерные для кумаринов полосы 1730 см <sup>-1</sup> (оксогруппа α-пирона), 1620 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо)); - данные метилирования метилсульфатом (скопарон); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом
II	эскулетин (6,7-дигидроксикумарин)	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	269 – 270	-	- данные элементного состава; - данные метилирования диметилформамидом в ацетоне б/в (скопарон); - хроматографически - ТСХ на пластинках силикагеля в системе толуол – этилацетат – кислота уксусная (5:4:1) параллельно с достоверным образцом эскулетина – основное пятно по R <sub>f</sub> 0.45 и характеру флуоресценции идентично пятну достоверного образца; - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом эскулетина.
<i>Гликозиды кумаринов</i>					
III	эскулин (6-О-β-D-глюкопиранозил-7-гидроксикумарин)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	147 – 150	- 143° (метанол)	- данные элементного состава; - данные гидролиза 7 % серной кислотой (эскулетин и D-глюкоза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом эскулина.
<i>Агликоны флавоноидов</i>					
IV	лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоон)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	328 – 330	-	- данные элементного состава; - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - ИК-спектр (3410 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппы), 1652 см <sup>-1</sup> (оксогруппа γ-пирона), 1610 см <sup>-1</sup> , 1580 см <sup>-1</sup> , 1518 см <sup>-1</sup> и 1444 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо)); - температура плавления ацетильного производного (204 – 226)°С, определено 4 ацетильных остатка; - данные щелочной деструкции (флороглюцин и 3,4-дигидроксибензойная кислота); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом лютеолина.



Таблица (продолжение)

Код	Вещество идентифицировано как	Брутто-формула	Т.пл. (°С)	Оптическое вращение	Методы идентификации*
V	кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифла- вон)	$C_{15}H_{10}O_6$	273 – 275	-	- данные элементного состава; - ИК-спектр ( $3340\text{ см}^{-1}$ и $3200\text{ см}^{-1}$ (гидроксигруппы), $1650\text{ см}^{-1}$ (оксогруппа $\gamma$ -пирона), $1570\text{ см}^{-1}$ та $1510\text{ см}^{-1}$ (ароматическое кольцо)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - температура плавления ацетильного производного ( $181 - 183$ )°С, в котором определено 4 ацетильных остатка; - данные щелочной деструкции (флороглюцин и п-оксибензойная кислота); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом кемпферола.
VI	кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифла- вон)	$C_{15}H_{10}O_7$	309 – 311	-	- данные элементного состава; - ИК-спектр ( $3385\text{ см}^{-1}$ , $3300\text{ см}^{-1}$ (гидроксигруппы), $1665\text{ см}^{-1}$ , $1625\text{ см}^{-1}$ (оксогруппа $\gamma$ -пирона), $1581\text{ см}^{-1}$ , $1565\text{ см}^{-1}$ , $1515\text{ см}^{-1}$ (ароматическое кольцо)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - температура плавления ацетильного производного ( $196 - 198$ )°С, в котором определено 5 ацетильных остатков; - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом кверцетина.
<i>Гликозиды флавоноидов</i>					
VII	никотифлорин (3-O-(6''-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-5,7,4'-тригидроксифла- вон)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	220– 223	- 24,0° (метанол)	- данные элементного состава; - ИК-спектр ( $3430\text{ см}^{-1}$ , $3185\text{ см}^{-1}$ (гидроксигруппы), $1659\text{ см}^{-1}$ (оксогруппа $\gamma$ -пирона), $1580\text{ см}^{-1}$ , $1519\text{ см}^{-1}$ , $1505\text{ см}^{-1}$ (ароматическое кольцо) и полоса $890\text{ см}^{-1}$ ( $\beta$ -гликозидная связь)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - данные ферментативного гидролиза (кемпферол, D-глюкоза, L-рамноза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом никотифлорина.

4. Ji-Eun Shin, Myung Joo Han, Myoung-Chong Song et al. 5-Hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: a Pancreatic Lipase Inhibitor Isolated from *Alpinia officinarum* // Biol. Pharm. Bull. – 2004. – Vol. 27, No. 1. – P. 138 – 140.

5. Маслова Н.Ф., Діхтярьов С.І., Любецька Ж.А., Кузнецова І.В. та ін. Перспективи розробки оригінальних лікарських засобів на основі рослинних інгібіторів ферментів // Клінічна фармація. – 1999. – Т. 3, № 2. – С. 141-144.

6. Young-Suk Kim, Eun-Ah Jung, Ji-Eun Shin et al. Daio-Orengedokuto Inhibits HMG-CoA Reductase and Pancreatic Lipase // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – Vol. 25, No. 11. – P. 1442-1445.

7. Проект общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистический анализ результатов химического эксперимента» // Фармаком. – 2002. - № 1. – С. 15 – 48.

Таблица (продолжение)

Код	Вещество идентифицировано как	Брутто-формула	Т.пл. (°С)	Оптическое вращение	Методы идентификации*
VIII	изокверцитрин (3-О-β-D-глюкопиранозил-5,7,3',4'-тетрагидрокси-флавонон)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	227 – 229	- 69,0° (метанол)	- данные элементного состава; - ИК-спектр (3350 см <sup>-1</sup> , 2965 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппы), 1657 см <sup>-1</sup> (оксогруппа γ-пирона), 1565 см <sup>-1</sup> , 1500 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо), полоса 890 см <sup>-1</sup> (β-гликозидная связь)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - данные гидролиза 2 % серной кислотой (кверцетин и D-глюкоза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом изокверцитрина.
IX	кверцетин-3-О-сорозид (3-О-(2''-О-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозил)-5,7,3',4'-тетрагидрокси-флавонон)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	204 – 206	- 26° (метанол)	- данные элементного состава; - ИК-спектр (3385 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппы), 1654 см <sup>-1</sup> (оксогруппа γ-пирона), 1580 см <sup>-1</sup> , 1513 см <sup>-1</sup> , 1452 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо), полоса 890 см <sup>-1</sup> (β-гликозидная связь)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - данные гидролиза 2 % серной кислотой (кверцетин, D-глюкоза); - данные гидролиза рамнодиаствой (кверцетин, софороза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом кверцетин-3-О-сорозида.
X	рутин (3-О-(6''-О-α-L-рамнопиранозил-β-D-глюкопиранозил)-5,7,3',4'-тетрагидрокси-флавонон)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	188 – 190	+ 11° (этанол)	- данные элементного состава; - ИК-спектр (3390 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппы), 1658 см <sup>-1</sup> (оксогруппа γ-пирона), 1612 см <sup>-1</sup> , 1575 см <sup>-1</sup> , 1510 см <sup>-1</sup> , 1455 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо), полоса 890 см <sup>-1</sup> (β-гликозидная связь)); - УФ-спектр и УФ-спектры с ионизирующими и комплексообразующими добавками; - данные гидролиза 2 % серной кислотой (кверцетин, D-глюкоза, L-рамноза); - данные гидролиза рамнодиаствой (кверцетин, рутиноза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом рутина.



Резюме  
Янченко П.С.

**Ліпазотропна активність субстанції піфламін та виділених із неї індивідуальних речовин фенольної природи**

Вперше визначено здатність субстанції піфламін, що виділена із трави *Pisum sativum* L., впливати на панкреатичну ліпазу. Із субстанції виділено 11 речовин кумаринової та фенольної природи: скополетин, ескуле-

тин, ескулін, кемпферол, лютеолін, кверцетин, нікотифлорин, ізокверцитрин, кверцетин-3-О-софорозид, рутин та астрагалозид. Астрагалозид виділено вперше. Досліджено ліпазотропну активність субстанції піфламін (активатор) та речовин, що виділені (ескулетин, ескулін, кемпферол, лютеолін, кверцетин, нікотифлорин, астрагалозид). Показано перспективність дослідження піфламіну як активатора панкреатичної ліпази.

Таблица (продолжение)

Код	Вещество идентифицировано как	Брутто-формула	Т.пл. (°С)	Оптическое вращение	Методы идентификации*
XI	астрагалозид (3-О-(6''-О-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозил)-5,7,4'-тригидрокси-3'-метоксифлавон)	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	201 – 205	– 58° (ДМФА)	- данные элементного состава; - ИК-спектр (3380 см <sup>-1</sup> , 3300 см <sup>-1</sup> (гидроксигруппы), 1660 см <sup>-1</sup> (оксогруппа γ-пирона), 1575 см <sup>-1</sup> , 1512 см <sup>-1</sup> , 1455 см <sup>-1</sup> (ароматическое кольцо) и полоса 890 см <sup>-1</sup> (β-гликозидная связь)); - данные кислотного гидролиза 2% серной кислотой (изорафнетин и D-глюкоза); - данные ферментативного гидролиза рамнодиаствой (генциобиоза и D-глюкоза); - отсутствие депрессии температуры плавления в пробе смешивания с достоверным образцом астрагалозида.

\* — для всех веществ в качестве предварительных исследований проводили качественные реакции и изучали хроматографическое поведение и характер флуоресценции

#### Summary

Yanchenko P.S.

#### Lipasetropic activity of piflamin substance and individual phenolic substances isolated from it

For the first time the capability of piflamin substance, isolated from *Pissum sativum* L. herb, for impact on pancreatic lipase was determined. Eleven substances of coumarinic and phenolic nature (scopoletine, esculetine, esculine, kaempferol, luteolyne, quercetin, nicotiflorin, isoquercitrine, quercetin-3-O-sophoroside, rutin and astragaloside) were isolated from piflamin substance. The astragaloside has been isolated from piflamin for the first time. The lipa-

setropic activity of piflamin substance (activator) and isolated substances (esculetine, esculine, kaempferol, luteolyne, quercetin, nicotiflorin, astragaloside) was investigated. The availability of piflamin study as pancreatic lipase activator was shown.

**Янченко Павел Сергеевич** (р. 1978). Окончил Национальную фармацевтическую академию Украины (2000). Аспирант кафедры фармакогнозии Национального фармацевтического университета.

## Міжнародні конференції, семінари, виставки

### Информация о XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство»

Очередной XI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» проходил в г. Москве с 19 по 23 апреля 2004 года. Как и все предыдущие, Конгресс сопровождался крупной международной фармацевтической выставкой.

Организаторами Конгресса являлись Министерство здравоохранения РФ; Министерство промышленности, науки и технологий РФ; Российская Академия наук; Российская Академия медицинских наук; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека». Генеральный спонсор Конгресса - международный фармацевтический концерн «Авентис», главные спонсоры - известные зарубежные компании: «Берингер Ингелхайм», «ГлаксоСмитКлайн», «КРКА», «Пфайзер», «Сервье». Спонсорскую поддержку Конгрессу оказывали также 15 других, в основном, зарубежных фармацевтических компаний.

Российские конгрессы «Человек и лекарство» проводятся с 1992 года и по своей организационной форме, цели, задачам и широчайшему охвату проблематики являются уникальным событием международного масштаба. В работе Конгресса принимали участие 30 научных и общественных российских и зарубежных организаций, 44 фармацевтические компании РФ и дальнего зарубежья.

Последние 9 лет бессменным Президентом Конгресса является клиницист-пульмонолог с мировым именем, учёный 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 специалистов практической медицины и научных работников различных областей медицины и фармации с современными методами фармакотерапии и профилактики важнейших болезней человека. Наряду с этим, значительное место в программах всех конгрессов занимают вопросы доказательной медицины, перспективные концепции создания новых лекарств, гармонизация с мировыми стандар-

тами фармакотерапии, деятельность контрольно-разрешительной системы по лекарствам в России, организация и деятельность фармацевтического рынка в России, современные информационные технологии в медицине и фармации и др.

Отсюда понятна широкая финансовая поддержка этого и предыдущих конгрессов ведущими фармацевтическими компаниями мира, которые осуществляют промоушн своей продукции на многочисленных мероприятиях и выставках с участием тысяч работников практической медицины и фармации. В частности, по данным Президента Конгресса академика А.Г. Чучалина, во всех мероприятиях настоящего Конгресса приняли участие свыше 40 тыс. человек.

Общее число официальных участников Конгресса составило около 4000 человек, в т.ч. 411 человек из Украины, представители нашей страны участвовали в различных мероприятиях Конгресса и проявили высокий уровень знаний и профессионализма.

Основные направления работы XI Конгресса:

Реализация концепции рационального использования лекарств и управления качеством фармакотерапии в РФ.

Клинические рекомендации по лечению основных заболеваний человека.

Медицина, основанная на доказательствах. Современная методология клинических исследований лекарственных средств.

Фармацевтическая промышленность - практическому здравоохранению.

Новейшие лекарственные средства.

Актуальные проблемы безопасности лекарственных средств.

Основные события по Программе XI Конгресса освещались в пленарных докладах и актовых лекциях, посвящённых наиболее значимым достижениям и стратегическим концепциям в области здравоохранения и применения лекарственных средств, а также на многочисленных симпозиумах по актуальным вопросам фармакотерапии широкого круга болезней человека, каждый из которых включал от 4 до 12 лекций. Наряду с этим проводились семинары, дискуссии, лекции и

школы для практических врачей, конкурсы молодых учёных и ряд других мероприятий, главным образом, по вопросам современной фармакотерапии.

В Программе Конгресса среди наиболее массовых по относительному количеству лекций и других событий были темы, касающиеся фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, воспаления и боли, нервно-психических болезней, заболеваний печени и желудка, заболеваний лёгких, инфекционных заболеваний, болезней женского организма, онкологических заболеваний.

Современные концепции фармакотерапии воспаления и боли с помощью современных нестероидных противовоспалительных средств — ненаркотических анальгетиков были представлены на ряде симпозиумов: «Современные подходы к терапии острого болевого синдрома», «Острая боль в широкой врачебной практике», «Ингибиторы ЦОГ-2: эффективность и влияние на качество жизни», «Боль и анальгетики», «Болевые синдромы в медицинской практике. Место и роль НПВС», «Использование комбинированных препаратов — новый подход к терапии боли».

Воспаление и боль — полиэтиологическая проблема, затрагивающая качество жизни подавляющего большинства пациентов практически всех нозологических групп. Отсюда на мировом фармацевтическом рынке нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) — ненаркотические анальгетики — самая распространённая группа лекарственных средств. Это направление продолжает оставаться актуальным среди исследователей-разработчиков новых лекарств.

Так, отдельные лекции были посвящены новому препарату компании «Берлин-Хеми» дексалгину — соли декскетопрофена треметамола, обладающего периферическим и центральным обезболивающим действием и предназначенным для терапии болевого синдрома умеренной и средней тяжести.

Твёрдые позиции среди врачей и пациентов приобрели представители нового поколения НПВС — селективные ингибиторы ЦОГ-2, которые постепенно приходят на смену традиционным НПВС — ингибиторам ЦОГ-1. В свете последних открытий о патогенетических факторах воспаления и мишенях лекарственного воздействия, вероятно, следует отказаться от общего названия «НПВС» и разделить эту группу лекарств, по крайней мере, на две: селективные ингибиторы ЦОГ-2 или ЦОГ-1 — сберегающие препараты и неселективные ингибиторы ЦОГ.

На большинстве симпозиумов по проблеме НПВС-ННА обсуждались различные аспекты терапии и безопасности известных НПВС последних поколений. Среди них особое внимание было уделено целекоксибу (целебрекс), который в терапевтическом диапазоне доз подавляет активность только ЦОГ-2, оказывает мощный и длительный анальгетический и противовоспалительный эффект, имеет высокую степень безопасности, превосходя диклофенак, ибупрофен и напроксен в отношении влияния на желудочно-кишечный тракт.

Подчёркивалась полипрагматическая роль НПВС. В частности, убедительно доказана их лечебно-профилактическая эффективность при эпителиальных опухолях толстого кишечника.

Учитывая, что НПВС имеют широчайшее распространение, исследуется их взаимодействие при комбинированном применении, а также влияние на клинические эффекты другой широко используемой группы лекарств — кардиологические препараты (ингибиторы АПФ (ИАПФ), бета-блокаторы). Очевидно, НПВС, особенно в высоких дозах, ослабляют антигипертензивное действие ИАПФ в результате ингибирования ими натрий-уретического гормона с задержкой в организме натрия и калия. В меньшей степени, но также ослабляется антигипертензивный эффект бета-блокаторов. Не изменяется под влиянием НПВС действие блокаторов медленных Са-каналов дигидропиридинового ряда.

На данном Конгрессе практические очертания приобрела концепция фармакотерапии комбинированными анальгетиками, имеющая ряд очевидных позитивных аспектов в плане повышения эффективности и безопасности обезболивания, особенно при хроническом болевом синдроме. В этом направлении участникам Конгресса был представлен таблетированный препарат «Залдиар» компании «Грюненталь», содержащий низкодозовую комбинацию трамадола и парацетамола.

Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний традиционно была наиболее часто обсуждаемой темой, которой были посвящены свыше 30 симпозиумов, образовательных семинаров, лекций, школ и клинических разборов для практических врачей. Главными темами этих мероприятий были артериальная гипертония и развивающиеся в ассоциации с ней другие болезни сердца и сосудов: атеросклероз, острая и хроническая сердечная недостаточность, а так-

же хроническая венозная недостаточность нижних конечностей.

Как и на предыдущих Конгрессах, большинство сообщений было посвящено современным высокоэффективным препаратам для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Обращает на себя внимание концептуальное заявление, сделанное на одном из симпозиумов, что сегодня мировая клиническая медицина окончательно определилась с 5 группами препаратов, предназначенных для терапии широкого круга ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний. Это — ингибиторы АПФ, диуретики, блокаторы рецепторов ангиотензина II, бета-блокаторы, блокаторы кальциевых каналов. Последовало также еще одно концептуальное заявление, что подведена черта дискуссиям и признаны доказательно как неэффективные 2 группы препаратов — альфа-блокаторы и агонисты имидазолиновых рецепторов.

Тем не менее, на другом симпозиуме, наоборот, обсуждалась и подчёркивалась необходимость присутствия в арсенале кардиологических препаратов альфа-блокаторов, одним из представителей которых является широко известный доксазозин.

На первом месте по-прежнему стоят ингибиторы АПФ, среди которых на сегодня признан как один из наиболее перспективных квадропринл.

Продолжает активно развиваться и возрастать роль холестеринснижающей терапии с помощью статинов. Фармакологический контроль уровня холестерина в крови, так же как и контроль артериального давления обеспечивают благоприятный прогноз и качество жизни пациентов. Благодаря многим новым терапевтическим свойствам, не связанным с гиполипидемическим действием, расширяется спектр использования статинов. В частности, доказаны такие важные эффекты статинов, как повышение барьерной функции эндотелия сосудов, сосудорасширяющий с повышением синтеза NO, антиишемический, антитромботический с повышением фибринолиза и снижением агрегации тромбоцитов, противовоспалительный в отношении стенок сосудов, антиаритмический, регресс гипертрофии левого желудочка, тенденция к снижению онкогенности, предотвращение болезни Альцгеймера, иммунодепрессивный, предотвращение остеопороза, растворение холестериновых камней.

Подчёркивалось, что на смену биотехнологическим приходят синтетические стати-

ны, обладающие не менее высокой эффективностью, но значительно меньшими побочными эффектами, чем, например, симвастин, правастатин и др. Озвучено, что препарат на основе статина можно признать эффективным, если он в минимальной терапевтической дозе обеспечивает достижение целевого уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) у 75 % пациентов. По этому критерию одним из наиболее перспективных признан розувастатин — гидрофильный синтетический статин, препарат которого кресатор завершил многоцентровые клинические испытания.

Прозвучало напоминание, что статины — не безобидные препараты, примером чему служит чрезвычайно эффективный ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы церивастатин (байкол) компании «Байер», снятый два года назад с продвижения, т.к. при клинических испытаниях препарат вызывал рабдомиолиз и смертельные исходы.

Как негативное явление подчёркивалось, что в РФ (как вероятно и в других постсоветских странах) частота применения статинов в десятки раз ниже, чем в развитых государствах.

На большинстве симпозиумов по современным методам фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний продолжила развитие утвердившаяся в последние годы концепция предпочтительной целесообразности лечения артериальной гипертонии и хронической сердечной недостаточности низкодозовыми фиксированными комбинированными препаратами, которая эволюционировала в течение сравнительно короткого времени от лечения тяжёлой злокачественной гипертонии до лечения её начальных, лёгких форм. Утратила значение монотерапия, которая требует ступенчатого назначения, длительного времени и в практической жизни доказавшая свою низкую эффективность и ряд других негативных сторон.

Минздрав РФ издал распространявшиеся на Конгрессе Методические рекомендации по комбинированной терапии больных артериальной гипертонией, в которых в зависимости от клинических ситуаций чётко аргументированы рекомендуемые рациональные комбинации, а также приведены иррациональные комбинации.

Однако нельзя не отметить, что дискуссия по поводу некоторых комбинаций ещё, очевидно, не закончена, и на ряде симпозиумов в отношении некоторых из них высказыва-

лись диаметрально противоположные взгляды.

Если говорить о конкретных кардиологических препаратах, то на состоявшемся Конгрессе не прозвучали какие-то принципиально новые субстанции, а продолжали докладываться уже известные средства указанных групп с информацией, углубляющей и подтверждающей их эффективность.

Некоторые симпозиумы были посвящены важной роли антиагрегантной терапии в кардиологии и ангиологии. Среди соответствующих препаратов по-прежнему в первых рядах клопидогрель (плавикс).

Значительно меньше, чем в прежние годы было уделено внимания вопросам оптимизации энергетического метаболизма миокарда при ишемической болезни сердца. На соответствующих симпозиумах с этой целью по-прежнему рекомендуются L-карнитин, милдронат, триметазидин, глюкозо-инсулино-кальциевая смесь.

На симпозиуме по фармакотерапии хронической венозной недостаточности среди так называемых венотропных препаратов как самый эффективный продолжает обсуждаться детралекс (микроионизированный диосмин).

На XI Конгрессе, как и на предыдущих конгрессах, большое внимание было уделено вопросам фармакокинетики: от создания новых лекарственных средств до клинической практики. Впервые на Конгрессе был сделан доклад представителем ГП ГНЦЛС — зав. лабораторией экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики к.б.н. Либиной В.В. в соавторстве с к.х.н. Резниченко А.А. «Экспериментальные фармакокинетические исследования противовоспалительных средств в разных лекарственных формах». В докладе были отражены результаты исследований Центра по разработке различных видов лекарственных форм (таблетки, мази, гели, суппозитории, растворы для инъекций и др.) для наиболее актуальных препаратов противовоспалительного действия (нимесулид, индометацин, кеторолак, бетаметазон и др.). Доклад вызвал большой интерес у специалистов.

Значительное место в мероприятиях Конгресса заняли вопросы фармакотерапии гастро-эзофагальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), частота заболеваемости которой, негативное влияние на качество жизни и прогноз отодвинули на второй план даже пробле-

му язвенной болезни и других кислот-зависимых заболеваний желудка.

Ведущим симптомом ГЭРБ признана изжога, отмечаемая больным не менее двух дней в неделю. Большинство пациентов нуждается в длительном (8-12 недель) лечении до момента полного исчезновения проявления заболевания. Важное место в комплексной терапии этого заболевания занимают антисекреторные препараты, снижающие выработку кислоты желудком ( $H_2$ -блокаторы гистамина), и ингибиторы протонной помпы в виде монотерапии или в сочетании с препаратами, улучшающими моторику ЖКТ. Преимущество антисекреторных препаратов первой группы заключается в более быстром снижении кислотности, а также существенно меньшей стоимости курса лечения. Преимущество второй — в более выраженном эффекте, который, однако, может стать чрезмерным. Поэтому назначение высоких доз препаратов из группы блокаторов протонной помпы необходимо при наличии тяжелых эзофагитов или в случае отсутствия эффекта при применении  $H_2$ -блокаторов гистамина.

При фармакотерапии заболеваний гепатобилиарной системы обращалось внимание на мебеверин (дюспаталин) - миотропный спазмолитик, высокоселективный в отношении сфинктера Одди и более эффективный, чем известные но-шпа и папаверин.

Темами нескольких симпозиумов была фармакотерапия хронических диффузных заболеваний печени вирусной этиологии — гепатитов В, С и дельта-гепатита, которая должна быть дифференцированной и очень длительной. Гепатит В предлагается лечить комбинацией препаратов интерферон + ламивудин. Гепатит С — комбинацией препаратов пегинтерферон альфа-2b (пегасис) + рибавирин. Указанные противовирусные средства не производятся в Украине и их воспроизводство, учитывая тяжёлое клиническое течение вирусных гепатитов В и С и всё большую распространённость этих заболеваний в Украине, представляется крайне необходимым.

Одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения является остеопороз, этиология которого обусловлена многими факторами, прежде всего гормональными сдвигами, преимущественно у женщин в период постменопаузы, а также под влиянием терапии стероидами. На современном этапе фармакотерапии остеопороза наиболее эффек-



тивным средством признан алендронат, воздействующий на ряд ключевых процессов патогенеза остеопороза.

Большой интерес представлял симпозиум «Современные ноотропные препараты», на котором была дана характеристика отечественных препаратов ноотропного и нейропротекторного действия. Было обращено внимание на перспективы применения мексидола для профилактики и лечения нарушений, возникающих в экстремальных ситуациях. Мексидол предупреждает и устраняет негативное влияние на организм таких факторов как стресс, шок, лишение сна, гипоксия. Механизм действия мексидола определяется его мембранопротекторными и антиоксидантными свойствами, модулирующим влиянием на рецепторы, ионные каналы, мембраносвязанные ферменты, влиянием на энергетический обмен, иммуномодулирующим действием. Препарат рекомендуется лицам, деятельность которых связана с работой в чрезвычайных и осложненных ситуациях: военнослужащие, спортсмены, лица, оказавшиеся в экстремальных ситуациях.

Дана также информация о новом препарате пропротене, который оказывает выраженное антиагрессивное действие в условиях моделей немотивированной и мотивированной агрессии. Высокая активность пропротена на модели мотивированной агрессии позволяет предположить возможность участия коры больших полушарий в осуществлении указанного эффекта. В условиях экспериментальной модели болезни Альцгеймера пропротен не уступает по эффективности эталонному ноотропу пирацетаму и в отличие от него воздействует на эмоциональную сферу, что позволяет рассматривать пропротен в качестве перспективного средства лечения и профилактики болезни Альцгеймера. Пропротен также представляет интерес для лечения и профилактики геморрагических инсультов; в отличие от препарата сравнения нимодипина, он влияет на эмоциональную среду, устраняя повышенную тревожность.

Внимание многих специалистов привлек симпозиум «Оптимизация фармакотерапии и лекарственного обеспечения». В докладе Белоусова Ю.Б. «Место современных препаратов в клинической практике. Особенности Российского фармацевтического рынка» были отражены следующие факты: за последние 10 лет количество зарегистрированных в России препаратов увеличилось в 5 раз (в 1990 году было зарегистрировано 3500 наиме-

нований, а в 2002 году список уже составил 17000 наименований). По этому показателю Россия может быть сравнима с ведущими странами мира. Между тем, российский рынок значительно уступает по объему, составляя лишь 1 % мирового фармацевтического рынка (около 3.5 млрд. долл. США). Основной причиной этого является доминирующая доля давно выпускаемых препаратов, средняя цена которых не превышает 1 долл. США (около 70 % всех лекарственных препаратов, назначаемых врачами и покупаемых российскими пациентами). Среди препаратов, которые ежегодно регистрируются в России, отмечается значительно большее количество генериков, чем оригинальных препаратов. Одних только субстанций диклофенака зарегистрировано несколько десятков, при этом основным назначаемым препаратом по-прежнему остается оригинальный препарат «Вольтарен».

Отдельной проблемой является защита оригинальных препаратов от копирования и просто откровенного подделывания. Подделываются как отечественные, так и зарубежные лекарственные препараты. Ведущим фактором жизненного цикла препаратов в США является патентная защита. Годы и средства, затраченные компаниями на разработку новейших лекарственных препаратов, защищены патентом. Это позволяет инновационным компаниям инвестировать средства в развитие науки и дальше заниматься разработкой новых препаратов.

Далее докладчик отметил, что в России, не очень отличающейся по структуре заболеваемости от других стран мира, где первое место, как и в других странах мира, занимают сердечно-сосудистые заболевания, одно из первых мест по продажам занимает но-шпа, а в десятку лидеров вошел препарат «Виагра». Для сравнения: в США основная доля представлена 10 терапевтическими классами, лидерами по количеству выписанных рецептов являются липитор и зокор — препараты, снижающие уровень холестерина.

Явные отличия в уровне лекарственного обеспечения в России обусловлены экономической ситуацией и теми реальными средствами, которыми российское здравоохранение обладает на сегодняшний день. Однако среди самых распространенных препаратов есть и далеко не дешевые препараты, уже не столь эффективные, как их современные аналоги, и не столь безопасные, но тем не менее все еще активно используемые.

Еще одной отличительной особенностью российского лекарственного рынка является высокий уровень самолечения: 67 % всех препаратов — это препараты, отпускаемые без рецепта. Отдавая отчет, что при покупке препарата без рецепта роль врача или провизора невелика, необходимо тщательно контролировать безопасность препаратов, ежегодно пополняющих этот список.

На этом же симпозиуме в докладе Гуськовой Т.А. «Доклиническая оценка токсичности воспроизведенных лекарственных средств как основа их безопасного применения в клинике» отмечается, что безопасность каждого лекарственного средства оценивается по соотношению его эффективности и токсичности. О равной эффективности воспроизведенного препарата и его прототипа можно судить по сравнительной биоэквивалентности, которая свидетельствует о скорости и полноте поступления действующего вещества из лекарственной формы в организм. Однако данное исследование не обеспечивает контроль идентичности вспомогательных веществ и их влияния на токсичность готовой лекарственной формы. Поэтому на стадии доклинического изучения воспроизведенного лекарственного препарата необходима оценка его токсичности в сравнении с прототипом.

В настоящее время Фармакологическим комитетом Минздрава России принято решение считать необходимым проведение токсикологических исследований воспроизведенных препаратов в следующих случаях:

а) если препараты не разрешены к медицинскому применению в стране-производителе и отличаются по составу от аналогичных препаратов, зарегистрированных в России;

б) если препараты не отличаются по составу, но содержат ингредиенты не фармакопейного качества;

в) если препараты получены на основе биотехнологии (в любых случаях).

Минимальный объем токсикологических исследований воспроизведенных лекарственных средств должен включать:

а) сравнительное изучение острой токсичности на грызунах при том способе введения, который указан в инструкции по применению препарата;

б) сравнительное изучение субхронической токсичности на животных (крысы, кролики, собаки или др.) при введении препарата не менее 2 недель, при способе применения, указанном в инструкции, в дозах, вызывающих токсический эффект, с обязатель-

ным гистологическим исследованием внутренних органов и области введения препарата.

Только равные токсические свойства воспроизведенного препарата и его зарегистрированного прототипа могут свидетельствовать об их идентичности по показателям токсичности.

Такой подход к оценке безопасности воспроизведенных отечественных препаратов вполне оправдан, так как при сопоставимой биоэквивалентности и идентичной токсичности можно говорить о равной степени безопасности воспроизведенного препарата и его аналога, зарегистрированного в России.

Интересным был симпозиум «Спортивная фармакология и медицина», на котором были освещены основные принципы фармакологической подготовки к Олимпийским играм 2004 года. Представлены новые препараты L-карнозин и нобен.

При применении L-карнозина в течение 20 дней у спортсменов высокой квалификации повышается работоспособность и проявляется выраженное антиоксидантное действие, так как препарат снижает индуцированное повышение хемилюминесценции при выполнении физической нагрузки. L-карнозин может быть рекомендован в спортивной медицине как недопинговое средство.

Нобен способствует более быстрому усвоению тренировочных навыков и сохранению координации движений. Выявлено его протекторное действие на сердечно-сосудистую систему. Антиоксидантные свойства препарата подтверждены в тесте хемилюминесценции. Нобен может быть рекомендован в спортивной медицине как средство, повышающее работоспособность и ускоряющее восстановление спортсменов.

Уделено внимание также цитаминам (эпифамин, гепатамин, корамин, церебрамин, тимусамин, супренамин и тирамин), которые повышают работоспособность экспериментальных животных. В качестве препаратов сравнения использовались элтон, леветон, левзея, элеутерококк, китайский лимонник, родиола розовая. Ряд цитаминов оказывал анаболизирующее, иммуномодулирующее и антиоксидантное действие. Сделан вывод о возможности внедрения этих препаратов в практику подготовки спортсменов высокой квалификации.

Большой интерес делегатов Конгресса вызвало пленарное заседание Общества клинических исследователей «Генерики: нацио-

нальное достояние или национальная беда». Отмечено, что генерики являются обязательным явлением на рынке всех стран мира. Однако их доля заметно колеблется на рынках разных стран: США — 25 %, Германия — 35 %, Польша — 61 %, Россия — 78 %. В РФ в 2003 году зарегистрировано 1128 новых генериков отечественного и зарубежного производства, при этом большая часть из них (76.5 %) разрешена к применению в РФ без проведения дополнительных исследований. Определённую озабоченность вызывает обилие некоторых однотипных препаратов разных фирм. Например, в РФ зарегистрировано 132 препарата диклофенака, из них 58 — российского и 28 — индийского производства.

При специальных проверках качество многих генериков не выдерживает никакой критики. Считают, что в интересах здоровья пациентов к регистрации можно принимать только те генерики, в отношении которых доказаны фармацевтическая, фармакокинетическая и терапевтическая эквивалентность. При наличии банка добровольцев исследование биоэквивалентности на российских клинических базах занимает около 1.5 мес. Однако, количество таких баз крайне мало для того, чтобы осуществлять оценку биоэквивалентности даже незначительной части генериков, которые поступают на регистрацию.

Несмотря на низкую стоимость производства воспроизведенных лекарственных средств по сравнению с оригинальными, их применение в клинической практике по ряду причин зачастую не имеет реальных экономических преимуществ. Так, в процессе производства генериков возможны отклонения от технологического процесса, использование фармацевтической субстанции с меньшей степенью чистоты, других вспомогательных веществ по сравнению с оригинальным препаратом. Все вышеуказанное может привести к тому, что терапевтическая эффективность воспроизведенного препарата будет значительно ниже, чем оригинального. Кро-

ме того, по тем же причинам может значительно измениться и профиль безопасности воспроизведенного препарата. Отсутствие терапевтической эквивалентности генерика и брэнда, учащение случаев возникновения неблагоприятных побочных реакций требует увеличения материальных затрат на проводимую фармакотерапию.

Применение генериков в реальной клинической практике имеет экономические преимущества только в случае клинически доказанной терапевтической эквивалентности.

В ходе участия в работе Конгресса и посещения фармацевтической выставки приобретены многочисленные информационные и справочные материалы, которые в настоящее время анализируются, систематизируются и доводятся до сведения заинтересованных специалистов ГП ГНЦЛС.

Таким образом, Конгресс является фундаментальной научной базой, позволяющей получать новейшую информацию о патогенетических механизмах заболеваний, новых препаратах, современных требованиях к доклиническому изучению препаратов и их безопасности.

Участие в работе Конгресса дает возможность оценить номенклатуру фармацевтического рынка Российской Федерации и ознакомиться с новейшими импортными препаратами, появившимися на рынке России или проходящими мониторинговые исследования; позволяет определить оптимальные направления и конкретные объекты в разработке новых препаратов и выйти с соответствующими предложениями как по воспроизводству генериков, так и по проведению поисковых исследований по созданию новых лекарственных средств; ознакомиться с системой регистрации лекарственных средств в РФ и за рубежом; приобрести современную справочную литературу, каталоги, информацию о новых препаратах, монографии; получить сертификаты по обучению в различных школах и свидетельствующие о повышении теоретического уровня знаний и квалификации.

Маслова Н.Ф., Чайка Л.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

## До відома авторів журналу «Фармаком»

Для публікації на сторінках нашого журналу автори повинні дотримуватися таких вимог:

1. Стаття повинна мати такі необхідні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими або практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким і присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням одержаних наукових результатів; висновки з даного дослідження та перспективи подальших розвідок у даному напрямку.
2. Стаття має бути надрукована на папері формату А4 через 2 інтервали з полями 2.5 см з усіх боків, 28-30 рядків на сторінці, 60-65 знаків у рядку, розмір шрифту 14, шрифт Times New Roman або Arial.
3. Робота подається на українській мові (для авторів, що проживають за межами України – можливо на російській) у 2-х примірниках, підписаних усіма авторами.
4. Прізвище(а) автора(ів) слід зазначити на першій сторінці, далі привести назву організації або установи, де працює(ють) автор(и) та назву статті, також мають бути зазначені рубрики УДК.
5. Матеріали до публікації обов'язково мають включати резюме (російською, українською та англійською мовами), та відомості про кожного з авторів із зазначенням прізвища, ім'я та по батькові, наукового звання (посади) (із зазначенням року), наукового ступеня (із зазначенням року), місця роботи, службового та домашнього телефонів.
6. До статті мають бути прикладені супровідний лист та експертний висновок про можливість публікації у відкритому друці.
7. До статті мають бути прикладені всі використані в роботі таблиці, графіки та ін.; список літератури надається у відповідності до загальноприйнятих правил оформлення.
8. У статті не допускається скорочень слів, крім загальноприйнятих у науковій літературі. Усі вимірювання подаються у системі одиниць СІ. Усі аббревіатури мають бути розшифровані. У числах, що являють собою десяткові дроби, цілі числа від дробової частини слід відокремлювати крапкою.
9. Усі вищезазначені матеріали мають бути надані до редакції також на магнітному носії (дискета, диск).
10. Комп'ютерний набір статті має виконуватися у текстовому редакторі MS Word 97, у разі набору в іншій версії – у форматі RTF. Формули мають бути набрані у редакторі формул, що убудований до MS Word (Microsoft Equation 3.0.).
11. Вимоги до ілюстративного матеріалу:
  - ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті та мають бути підписаними;
  - графіки, діаграми та ін. краще будувати у табличному редакторі Excel 97. Якщо даний ілюстративний матеріал створений за допомогою інших програм, зображення слід подавати у векторному форматі WMF. Так як журнал видається у чорно-білому виконанні, графіки мають бути виконані з відповідними відтінками;
  - на графіках мають бути зазначені експериментальні точки;
  - фотографії, файли із растровими зображеннями мають бути високої якості та не мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар та ін.). Формати файлів TIFF, BMP;
  - криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки;
  - структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані в спеціалізованих програмах типу ChemWin та надані у векторному форматі WMF;
  - різні види ілюстративного матеріалу не мають дублювати один одного.
12. Редакція залишає за собою право редагувати статті.
13. Матеріали статті автору не повертаються.
14. При невиконанні зазначених вимог статті розглядатися не будуть.
15. За достовірність інформації в публікаціях відповідальність несуть автори.