

Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України*Гризодуб О.І., Губаревич І.Г., Карпова Т.О., Нікішина Л.Є., Леонтьєв Д.А.*

Стандартизована процедура валідації методик контролю залишкових розчинників у лікарських засобах методом газової хроматографії 5

До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України

Проект монографії «Анісова олія»	21
Проект монографії «Арахісова олія гідрогенізована»	24
Проект монографії «Арахісова олія рафінована»	25
Проект монографії «Бавовняна олія гідрогенізована»	26
Проект монографії «Гвоздична олія»	27
Проект монографії «Евкалиптова олія»	29
Проект монографії «Кориці китайської олія»	30
Проект монографії «Кориці цейлонської кори олія»	32
Проект монографії «Кориці цейлонської листя олія»	33
Проект монографії «Лавандова олія»	34
Проект монографії «Маслинова олія нерафінована»	36
Проект монографії «Маслинова олія рафінована»	38
Проект монографії «Мигдальна олія нерафінована»	39
Проект монографії «Мигдальна олія рафінована»	40

Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Питання введення в Державну Фармакопею України монографії «Глоду листя та квітки» 42

Фітохімічні дослідження*Добровольний О.О., Шаламай А.С.*

Перспективи екстрагування лікарської рослинної сировини надкритичними газами 48

*Комісаренко С.М.*Карденолідні глікозиди насіння *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. орнітогалін та родексин А 53**Аналіз***Зупанець І.А., Шебеко С.К.*

Уніфікація методів кількісного визначення ендogenousного глюкозаміну в біологічному матеріалі 56

Будова та властивості*Карпенко О.В., Сигорова І.В., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І., Портна О.О.*

Дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів та їх конденсованих аналогів 61

Проблеми. Пошук. Рішення.*Петрух А.І.*

Інноваційні продукти й оригінальний український препарат Флуренізид 67

-
- Заст. головного редактора д.фарм.н., професор Спиридонов В.М.
 - Рецензенти: к.фарм.н. Алмакаєва Л.Г.; д.фарм.н, професор, чл.-кор. НАНУ Георгієвський В.П.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; к.фарм.н. Деркач А.І.; д.фарм.н., професор Діхтярьов С.І.; к.фарм.н. Доля В.Г.; д.фарм.н., професор Казарінов М.О.; к.фарм.н. Котов А.Г.; д.х.н., професор Литвиненко В.І.; д.б.н., професор Маслова Н.Ф.; к.фарм.н. Новік І.І.; к.мед.н. Чайка Л.О.
 - Випуск підготували: Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Тихоненко Н.І.
 - Рекомендовано до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 8 від 19.12.2005 р.
 - Підписано до друку 23.12.2005 р. Тираж 500 прим.
-

Готові лікарські засоби*Загорій В.А., Стромко С.Б., Перемот З.П., Буцька В.Є.*

Науково-експериментальне обґрунтування зміни складу препарату
«Левоміцетин-Дарниця», таблетки по 0.5 г, у зв'язку із запровадженням
Доповнення 1 до Державної Фармакопеї України 74

Сигенко Л.М.

Дослідження з вибору допоміжних речовин для створення стабільних
очних/назальних крапель на основі екстракту біологічно активних речовин
тваринного походження 78

Стандартизація лікарських засобів*Андрюкова Л.М.*

Обсяг вибірки і норми вмісту часток в очних краплях
при контролі їхньої якості за показником «Механічні включення» 83

*Андрюкова Л.М., Георгієвський В.П., Курищук К.В., Назарова О.С.,**Сигенко Л.М., Фетисова О.Г., Харченко О.В.*

До питання про створення очних крапель на основі екстракту алое 87

Технологія лікарських засобів*Бегунова Н.В., Алмакаєва Л.Г., Шевченко І.В., Науменок Л.Г.*

Аспекти технології приготування парентеральних розчинів на основі
калієвої та магнієвої солей аспарагінової кислоти 93

Фармакологічні дослідження*Лар'яновська Ю.Б., Беркало Н.М.*

Вплив мазі «Веногепар» на морфологічні аспекти
експериментального тромбофлебиту у кролів 100

Щокіна К.Г., Вікторов О.П., Супрун Е.В., Іщенко О.М., Коваленко Є.М.

Порівняння антипроліферативної активності сучасних
та перспективних протизапальних засобів 104

Григор'єва Г.С., Белік Г.В., Дрогозов С.М., Столетов Ю.В.

Порівняння кардіопротекторних властивостей ліпосомальної
та водорозчинної лікарських форм кверцетину 107

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины*Гризодуб А.И., Губаревич И.Г., Карпова Т.А., Никишина Л.Е., Леонтьев Д.А.*

Стандартизованная процедура валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии 5

К изданию Дополнения 2 к Государственной Фармакопее Украины

Проект монографии «Анисовое масло» 21

Проект монографии «Арахисовое масло гидрогенизированное» 24

Проект монографии «Арахисовое масло рафинированное» 25

Проект монографии «Хлопковое масло гидрогенизированное» 26

Проект монографии «Гвоздичное масло» 27

Проект монографии «Эвкалиптовое масло» 29

Проект монографии «Корицы китайской масло» 30

Проект монографии «Корицы цейлонской коры масло» 32

Проект монографии «Корицы цейлонской листьев масло» 33

Проект монографии «Лавандовое масло» 34

Проект монографии «Оливковое масло нерафинированное» 36

Проект монографии «Оливковое масло рафинированное» 38

Проект монографии «Миндальное масло нерафинированное» 39

Проект монографии «Миндальное масло рафинированное» 40

Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Боярышника листья и цветки» 42

Фитохимические исследования*Добровольный А.А., Шаламай А. С.*

Перспективы экстрагирования лекарственного растительного сырья сверхкритическими газами 48

*Комиссаренко С.Н.*Карденолидные гликозиды семян *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. орнитогаллин и родексин А 53**Анализ***Зупанец И.А., Шебеко С.К.*

Унификация методов количественного определения эндогенного глюкозамина в биологическом материале 56

Строение и свойства*Карпенко А.В., Сидорова И.В., Беленичев И.Ф., Коваленко С.И., Портная Е.А.*

Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности 4-(N-ацил)гидразинохиназолинов и их конденсированных аналогов 61

Проблемы. Поиск. Решения.*Петрух Л.И.*

Инновационные продукты и оригинальный украинский препарат Флуренизид 67

Готовые лекарственные средства*Загорий В.А., Стромко С.Б., Перемот З.П., Буцкая В.Е.*

Научно-экспериментальное обоснование изменения состава препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, в связи с введением в действие Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины 74

Сиденко Л.Н.

Исследования по выбору вспомогательных веществ для создания стабильных глазных/назальных капель на основе экстракта биологически активных веществ животного происхождения 78

Стандартизация лекарственных средств*Андрюкова Л.Н.*

Объем выборки и нормы содержания частиц в глазных каплях при контроле их качества по показателю «Механические включения» 83

Андрюкова Л.Н., Георгиевский В.П., Курищук К.В., Назарова Е.С., Сиденко Л.Н., Фетисова Е.Г., Харченко О.В.

К вопросу создания глазных капель на основе экстракта алоэ 87

Технология лекарственных средств*Бегунова Н.В., Алмакаева Л.Г., Шевченко И.В., Науменов Л.Г.*

Аспекты технологии приготовления парентеральных растворов на основе калиевой и магниево-аспарагиновой кислоты 93

Фармакологические исследования*Ларьяновская Ю.Б., Беркало Н.М.*

Влияние мази «Веногепар» на морфологические аспекты экспериментального тромбоза у кролей 100

Щекина Е.Г., Викторов А.П., Супрун Э.В., Ищенко А.М., Коваленко Е.Н.

Сравнение антипролиферативной активности современных и перспективных противовоспалительных средств 104

Дрогозов С.М., Григорьева А.С., Белик Г.В., Столетов Ю.В.

Сравнение кардиопротекторных свойств липосомальной и водорастворимой лекарственных форм кверцетина 107

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.2/3.07

Гризодуб А.И., Губаревич И.Г., Карпова Т.А., Никишина Л.Е., Леонтьев Д.А.
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»
Институт патологии эндокринных заболеваний им. В.Я. Данилевского АМН Украины

Стандартизованная процедура валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии

Проведено систематическое рассмотрение вопросов, возникающих при валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии. Предложена статистически обоснованная стандартизованная процедура валидации таких методик в вариантах метода стандарта и метода добавок. Схема апробирована на примере валидации методики контроля остаточных растворителей в субстанции фенсукцинала методом газовой хроматографии.

Ранее нами были рассмотрены стандартизованные процедуры валидации методик количественного определения [1-2] и контроля сопутствующих примесей [3]. Контроль остаточных растворителей (ОР) имеет много общего с контролем сопутствующих примесей, однако, в силу ограниченного набора этих растворителей, гораздо легче поддается стандартизации. В частности, Государственная Фармакопея Украины (ГФУ) рекомендует идентификацию и контроль ОР проводить методом парофазной газовой хроматографии [4] по единой стандартизованной фармакопейной методике общей статьи 2.4.24. [5]. Хроматографирование проводят на капиллярных колонках (30 м), что позволяет добиться необходимой эффективности разделения большинства из 59 остаточных растворителей, описанных в ГФУ [6]. С целью нивелирования матричных эффектов (растворенное анализируемое вещество влияет на концентрацию ОР в паровой фазе) анализ проводится методом добавок [5].

Общая статья 2.4.24. ГФУ при разработке была гармонизована с Европейской Фармакопеей (ЕФ) 4.8 [7], которая, за исключением некоторых редакционных правок, соответствует действующему сейчас 5 изданию ЕФ [8].

Согласно ГФУ, стандартизованная фармакопейная методика [5] может применяться в следующих случаях:

1) для идентификации большей части ОР 1 и 2 классов токсичности в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах, если эти растворители неизвестны;

2) как испытание на предельное содержание ОР 1 и 2 классов токсичности, если они присутствуют в субстанциях, вспомога-

тельных веществах и готовых лекарственных средствах;

3) для количественного определения ОР 2 класса токсичности, если пределы их содержания превосходят 1000 ppm (0.1 %), или, если это необходимо, для количественного определения ОР 3 класса токсичности.

Как видно, данная методика может использоваться и как предельное (п. 2), и как количественное (п. 3) испытание. В случае предельного испытания валидация фармакопейной методики не требуется. В случае же количественного испытания в конкретном веществе необходима валидация [5]. Валидация методики необходима также в случае ее существенной модификации [9].

На практике применение методики статьи 2.2.24. вызывает ряд вопросов.

1. Не совсем понятна рекомендация общей статьи 2.2.24. [5] использовать данную методику для идентификации ОР, ведь ОР известны из технологии производства субстанции, вспомогательного вещества или готового лекарственного средства. Если же это не так, то такие продукты нельзя допускать на рынок, а значит, нет необходимости идентифицировать и контролировать в них ОР. Проблемы идентификации ОР иногда возникают, но это уже не фармакопейный анализ.

2. Применение методики статьи 2.2.24. требует достаточно длительного времени. Так, длительность одной хроматограммы ОР 2 класса для системы А достигает 40 мин, а таких хроматограмм требуется не менее шести.

3. В методике 2.2.24. используются достаточно реакционные растворители: вода, диметилформамид, диметилсульфоксид, диметилацетамид. Многие ОР (хлорированные углеводороды и сложные эфиры) в таких раствори-

телях (особенно при тех малых концентрациях, которые имеют место в методике) могут подвергаться сольволизу, особенно учитывая длительность анализа.

4. Методика 2.2.24. слишком общая, что затрудняет ее применение на практике. Действительно, если, например, в субстанции необходимо контролировать только 2-3 ОР, то какая необходимость использовать общую методику для контроля 59 растворителей?

5. Какова точность методики статьи 2.2.24.? Данный вопрос является достаточно актуальным при сравнении результатов анализа в разных контрольных лабораториях [10].

Учитывая все это, а также дороговизну оборудования для парофазного анализа, на практике достаточно часто приходится сталкиваться со случаем, когда условия методики статьи 2.2.24. [5] приходится модифицировать или полностью менять. Нередко целесообразно разработать простую непарофазную газохроматографическую методику, в том числе, и на набивных колонках. Такой анализ можно проводить как методом добавок, так и методами абсолютной калибровки (внешнего стандарта) или внутреннего стандарта [4]. Во всех этих случаях разработанные методики должны быть валидированы в соответствии с требованиями ГФУ [11]. При этом возникают вопросы, связанные с критериями приемлемости полученных результатов и стандартизацией процедуры проведения валидации. Интересно также сравнение применения методов стандарта и добавок.

В данном сообщении контроль ОР рассматривается только как предельное испытание, поскольку количественный анализ ОР не относится к контролю качества и в фармакопейном анализе встречается очень редко.

1. Теоретическая часть

Контроль остаточных количеств органических растворителей относится к предельным испытаниям [5]. В соответствии с общей статьей ГФУ [11] для предельных испытаний необходимо проверять только специфичность и предел обнаружения (ПО). Корректность данного положения, однако, вызывает большие сомнения. Действительно, ведь предельное испытание применяется для контроля качества субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств. По результатам этого испытания принимается заключение об их качестве (браковать или не браковать). Причем данное заключение должно воспроизводиться как в рамках данной лаборатории, так и в других лабораториях. Безусловно,

производитель должен обеспечивать такие количества ОР, чтобы гарантировать положительный результат в разных лабораториях (т.е. применять так называемые «гарантирующие допуски» [12]), однако для этого необходимо знать предельную полную неопределенность методики анализа (включая случайную и систематическую составляющие). Кроме того, данную неопределенность необходимо знать при разных концентрациях. Предельную неопределенность методики анализа характеризует в значительной степени ПО, однако лишь в том случае, если ПО находится из параметров линейной зависимости [3, 11].

В целом, предельные испытания концептуально мало отличаются от количественных определений с односторонними пределами [13]. Соответственно, валидация этих испытаний мало отличается от валидации количественных определений. Различие, фактически, сводится к большей допустимой неопределенности.

1.1. Предельно допустимая неопределенность анализа

Исходным пунктом разработки всех валидационных критериев является выяснение, какая неопределенность методики анализа является приемлемой. Фармакопейная методика контроля ОР [5] имеет критерии пригодности системы, что, казалось бы, позволяет выяснить, какая предельная неопределенность анализа является приемлемой. Однако понятие «предельная неопределенность методики анализа» является достаточно неопределенным в случае фармакопейной методики контроля ОР [5].

Контроль ОР в фармакопейной методике проводится методом добавок. К испытуемому раствору анализируемого вещества добавляются количества ОР, соответствующие их предельно допустимым по ГФУ концентрациям (ImL). Данный раствор используется в качестве раствора сравнения [6]. Проводится хроматографирование газовой фазы над испытуемым раствором и раствором сравнения (по 3 хроматограммы).

Рассчитывают средние значения площадей пиков анализируемых ОР из хроматограмм испытуемого раствора ($S_{test,j}$) и раствора сравнения ($S_{ref,j}$). Должно выполняться неравенство для каждого (j) ОР:

$$K_{lm,j} = \frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} \leq 0.5. \quad (1)$$

Рассчитывают 3 попарных разности площадей пиков $dif_j = S_{ref,j} - S_{test,j}$. Относительное стандартное отклонение ($RSD_{dif,j}$) этих 3 разностей для каждого (j) ОР не должно превышать 15 % (пригодность системы) [5]:

$$RSD_{dif,j} (3) \leq 15\%. \quad (2)$$

Относительный доверительный интервал среднего значения разностей площадей пиков (Δ_{dif}), соответствующий неравенству (2), равен [14]:

$$\Delta_{dif} \leq \frac{2.92 \cdot 15}{\sqrt{3}} = 25.3\%. \quad (3)$$

Критерием приемлемости содержания ОР в анализируемой пробе является соотношение (1), регламентирующее предельно допустимое значение отношения (K_{lm}) площадей пиков испытуемого и стандартного растворов. В то же время, точность методики регламентируется соотношением (2), устанавливающим требования к предельно допустимой точности разности площадей пиков стандартного и испытуемого растворов. Между соотношениями (1) и (2) нет простой взаимосвязи, поэтому величину Δ_{dif} нельзя считать неопределенностью методики. Казалось бы, неопределенностью методики можно считать неопределенность отношения K_{lm} (расчет ее смотрите ниже). Однако неопределенность величины K_{lm} мало характеризует неопределенность содержания ОР в анализируемой пробе, поскольку значительно меньше зависит от концентрации ОР, чем сама площадь пика ОР (в области ImL в два раза, в других диапазонах еще меньше).

Представляет интерес выяснение вопроса, каким же неопределенностям площадей пиков стандарта и испытуемого раствора соответствует соотношение (2), и какова при этом неопределенность величины K_{lm} .

Поскольку раствор сравнения представляет собой испытуемый раствор с добавкой ОР с концентрациями, соответствующими предельно допустимым по ГФУ (ImL), то для генеральных величин площадей j -ого ОР можно записать:

$$S_{ref,j} = S_{test,j} + S_{ImL,j}. \quad (4)$$

Здесь индекс «*ref*» относится к раствору сравнения, «*test*» - к испытуемому раствору, а «*ImL*» — к теоретической площади пика, соответствующей ImL .

Отсюда получим:

$$S_{ImL,j} = dif_j = S_{ref,j} - S_{test,j}. \quad (5)$$

Стандартное отклонение величины dif_j ($RSD_{dif,j}$) регламентируется соотношением (2).

С другой стороны, учитывая (5), в соответствии с [14], получим:

$$RSD_{dif,j}^2 = \frac{1}{S_{ImL,j}^2} \times (S_{ref,j}^2 \cdot RSD_{ref,j}^2 + S_{test,j}^2 \cdot RSD_{test,j}^2). \quad (6)$$

Наибольший интерес представляет предельная область, когда концентрация ОР близка к ImL . В этом случае площади S_{ref} и S_{test} не очень сильно различаются (в два раза), поэтому можно считать:

$$RSD_{test,j} = RSD_{ref,j}. \quad (7)$$

Тогда, учитывая (4), уравнение (7) приходит к виду:

$$RSD_{dif,j}^2 = \frac{RSD_{ref,j}^2}{S_{ImL,j}^2} \cdot [(S_{ImL,j} + S_{test,j})^2 + S_{test,j}^2]. \quad (8)$$

Поскольку S_{ImL} не зависит от S_{test} то из уравнения (8) видно, что RSD_{dif} растет с ростом S_{test} т.е. с ростом количества ОР в субстанции. Поэтому регламентация $RSD_{dif} \leq 15\%$ (2) [5] является неопределенной без указания S_{test} или, что то же самое, концентрации ОР в испытуемой пробе. Целесообразно провести регламентацию для концентрации ОР на уровне ее предельно допустимого содержания ImL (именно этот случай представляет наибольший практический интерес). Тогда $S_{test} = S_{ImL}$, и уравнение (8) приводится к простому виду (индекс «*j*» опускаем, поскольку предельные величины RSD_{ref} одинаковы для всех ОР):

$$RSD_{dif} = \sqrt{5} \cdot RSD_{ref}. \quad (9)$$

Учитывая требования ГФУ (2) к RSD_{dif} для числа попарных хроматограмм $n = 3$, т.е. числа степеней свободы $f = 2$, получим требования к RSD_{ref} :

$$RSD_{st}(f = 2) = \frac{RSD_{dif}}{\sqrt{5}} \leq \frac{15}{\sqrt{5}} = 6.7\%. \quad (10)$$

Уравнение (10) позволяет определить требования к относительному доверительному интервалу сходимости площадей параллельных хроматограмм. В соответствии с соотношением (7), они одинаковы для испытуемого и стандартного растворов [14]:

$$\Delta_{st} = \Delta_{test} \leq \frac{2.92 \cdot 6.7}{\sqrt{3}} = 11.3\%. \quad (11)$$

При проведении валидации получают результаты с большим числом степеней свободы, что позволяет уменьшить коэффициент Стьюдента. Среднее же значение, в соответствии с

[5] рассчитывается из 3 попарных введений. Требования к RSD_{st} при этом определяются соотношением [15-16]:

$$RSD_{st}(f) \leq \frac{t(95, f=2)}{t(95, f)} \cdot RSD_{st}(f=2). \quad (12)$$

Здесь $t(95, f=2) = 2.920$ — коэффициент Стьюдента для односторонней вероятности 95 % и числа степеней свободы $f = 2$; $t(95, f)$ — коэффициент Стьюдента для односторонней вероятности 95 % и числа степеней свободы f . При этом требования (11) к доверительному интервалу сходимости площадей пиков остаются прежними.

Из уравнения (12) получим величины RSD_{st} для наиболее распространенных чисел степеней свободы $f = 2, 3$ и 4 , а также генеральную величину ($f = \infty$):

$$\begin{aligned} RSD_{st}(f=2) &\leq 6.7\% \\ RSD_{st}(f=3) &\leq 8.3\%, \\ RSD_{st}(f=4) &\leq 9.2\%, \\ RSD_{st}(f=\infty) &\leq 11.9\%. \end{aligned} \quad (13)$$

Такой подход является общепринятым для ЕФ [9].

Уравнения (10-13) позволяют устанавливать такие требования к RSD_{st} раствора сравнения, которые обеспечивают выполнение требований (2) ГФУ [5] (или АНД), а также установить требования к параметрам линейной зависимости.

Из соотношений (1) и (11) можно получить требования к относительной неопределенности величины K_{lm} [14]:

$$\begin{aligned} \Delta_{lm} &= \Delta_{K,lm} = \sqrt{\Delta_{test}^2 + \Delta_{st}^2} = \\ &= \sqrt{2} \cdot \Delta_{ref} \leq \sqrt{2} \cdot 11.3 = 16.0\%. \end{aligned} \quad (14)$$

Статистически же незначимое различие между результатами двух лабораторий будет еще в $\sqrt{2}$ раз больше [14]. Таким образом, если в одной лаборатории получено значение $K_{lm} \geq 0.5$ (что соответствует нормализованной концентрации ОР [2] $X \geq 100\%$ от ImL , т.е. брак), то во второй лаборатории (работающей строго по ГФУ [5]) может быть:

$$\begin{aligned} K_{Limit} &\geq 0.5 \cdot 100 / (100 + \sqrt{2} \cdot \Delta_{K,lm}) = 0.41, \\ X_{Limit} &\geq 69\%. \end{aligned} \quad (15)$$

т.е. соответствие ГФУ. При этом величины $K_{lm} = 0.5$ и $K_{lm} = 0.41$ и соответствующие им нормализованные концентрации [2] $X = 100\%$ и $X = 69\%$ от ImL являются статистически неразличимыми.

Величины $K_{Limit} = 0.41$ и $X_{Limit} = 69\%$ из соотношения (15) можно рассматривать как нижние границы этих величин при выпуске продукции, обеспечивающие получение положительных результатов в контрольных лабораториях. В противном случае возможны расхождения в выводах о качестве анализируемого образца при статистически неразличимых (по ГФУ) результатах. Как видно, даже при содержании ОР $X = 70\%$ от ImL существует статистически значимая опасность забраковки анализируемого вещества по содержанию ОР.

Выражение (14) характеризует предельную неопределенность ($\Delta_{K,lm}$) единой фармакопейной методики контроля ОР, которая проводится в варианте метода добавок [5]. Возникает вопрос о том, какова предельно допустимая неопределенность методики анализа (Δ_{lm}) при использовании обычного метода внешнего (или внутреннего) стандарта [4]. Учитывая соотношение (7), нетрудно видеть, что она совпадает с $\Delta_{K,lm}$, что и отмечено в выражении (14).

Отметим, что полученные требования к неопределенности методик контроля ОР ($\Delta_{lm} \leq 16\%$) совпадают с полученными нами ранее совершенно из других соображений требованиями к неопределенности методик контроля примесей методом ВЭЖХ [3]. Это подтверждает достаточную общность этих требований.

1.2. Предел обнаружения

При исследовании точности методики анализа и нахождении предела обнаружения (ПО) и предела количественного определения (ПКО) основными являются исследования линейности [2].

Контроль ОР относится к предельным испытаниям [5]. В соответствии с [11] для таких испытаний при валидации необходимо находить только ПО.

В соответствии с ГФУ [11] величину ПО количественно можно находить двумя способами — из соотношения сигнал/шум и из характеристик линейной зависимости. Контроль ОР с помощью парофазной газовой хроматографии по методике 2.2.24. [5] является ярким примером малой применимости использования соотношения сигнал/шум для расчета ПО, поскольку данный подход учитывает только хроматографические составляющие неопределенности анализа и совершенно не принимает во внимание неопределенности пробоподготовки и дозирования пробы. В то же время пробоподготовка вносит основной вклад в

неопределенность анализа в случае жидкостной хроматографии с жидкими пробами [16]. Поскольку пробоподготовки в случае газовой (обычной или парофазной) и жидкостной хроматографий не отличаются, а точность их близка, то же самое можно сказать и об обычной газовой хроматографии. В случае парофазной газовой хроматографии дополнительными и очень важными факторами, влияющими на неопределенность методики анализа, являются дозирование газовой пробы и испарение легколетучих ОР из водных растворов. Поэтому расчет *ПО* из параметров линейной зависимости является значительно более надежным и объективным, поскольку учитывает как хроматографические, так и нехроматографические факторы.

Расчет *ПО* (в процентах к *ImL*) проводится по ГФУ [11]:

$$ПО = 3.3 \cdot SD_A / b, \quad (16)$$

где:

SD_A — стандартное отклонение свободного члена калибровочной прямой;

b — угол наклона калибровочной прямой.

Поскольку линейные зависимости строятся в нормализованных координатах, то SD_A и сам *ПО* находятся в процентах к предельно допустимому по АНД содержанию ОР (*ImL*).

Принципиальным положением является то, что мы не ищем предел обнаружения, а только доказываем, что он не превышает допустимый для нашей методики предел. Это соответствует общему подходу к контролю качества и валидации методик анализа лекарственных средств [2-3].

В случае предельных испытаний, относительный предел обнаружения ОР (*ПО*) должен быть незначим [17] по сравнению с предельно допустимой концентрацией ОР (*ImL*), которая в нормализованных координатах принимается за 100 %. Как показано, в нормализованных координатах должны выполняться соотношения [3]:

$$ПО \leq \max ПО = 32\%. \quad (17)$$

Интересно, что верхняя граница *ПО* примерно совпадает со статистически незначимым различием нормализованных концентраций в разных лабораториях ($100 - 69 = 31\%$) в соотношении (15), полученным из совершенно других соображений. Это говорит о достаточной общности соотношений (14) и (17).

1.3. Методика и диапазон

В соответствии с [11] при проверке линейности необходимо использовать не менее 5 точек.

Как показано [2-3], для количественных испытаний оптимальным числом точек является 9 (плюс 1 для стандарта, с помощью которого переводят данные в нормализованные координаты). Количественные испытания являются достаточно распространенными при контроле примесей методом ВЭЖХ. Это связано, например, с накоплением их (продуктов разложения) в процессе хранения, что вызывает необходимость контроля этого процесса накопления для определения срока годности. Поэтому методики контроля примесей методом ВЭЖХ обычно валидируют как количественные испытания [3].

В случае ОР никакого накопления их в процессе хранения быть не может — содержание ОР при хранении может только уменьшаться за счет испарения. Соответственно, нет необходимости изучать количественно динамику изменения ОР для установления срока годности. Поэтому методики контроля ОР обычно являются только предельными испытаниями, требования к неопределенности анализа которых гораздо либеральнее. Поэтому при изучении линейности этих методик нет необходимости в таком большом (9) количестве точек. Обычно вполне достаточно 5 (плюс 1 для стандарта для перевода данных в нормализованные координаты).

Для каждого раствора делается указанное в методе АНД количество повторных хроматограмм.

Диапазон методики зависит от того, в каком варианте проводится анализ — методом добавок [5] или методом внешнего (или внутреннего) стандарта [4].

1.3.1. Метод стандарта

Как показано ранее [3], целесообразно проводить изучение для 5 модельных растворов с концентрациями 25 %, 50 %, 75 %, 100 % и 125 % к *ImL*. В отличие от количественного контроля примесей [3], данные концентрации (модельные растворы) готовят в одном, а не двух повторях. Модельные растворы готовят с использованием предварительно высушенного анализируемого вещества (для удаления ОР) в той же концентрации, что и в методике. Для подтверждения того, что раствор высушенного анализируемого вещества не дает на хроматограмме пиков, которые могут перекрываться с пиками анализируемых ОР, готовят еще и холостой раствор (0) — раствор анализируемого вещества в том же растворителе и в той же концентрации, что и в модельных растворах (и в препарате). Необходимо также полу-

чить хроматограмму растворителя (*00*), чтобы убедиться в отсутствии на ней пиков, перекрывающихся с анализируемыми ОР.

Отметим, что если на хроматограмме холостого раствора (*0*) отсутствуют мешающие пики, то необходимости в исследовании хроматограмм растворителя (*00*) уже нет (поскольку растворитель также входит в холостой раствор). Но если на хроматограмме холостого раствора имеются мешающие пики, хроматограмма растворителя необходима.

Кроме того, для перевода в нормализованные координаты необходим также еще один раствор со 100 %-ной концентрацией (*st*). В отличие от модельных растворов и холостого раствора, *st* готовится без использования анализируемого вещества (как и в реальном анализе методом стандарта).

1.3.2. Метод добавок [5]

Особенностью метода добавок является то, что он требует линейности в гораздо более широком диапазоне, чем обычный метод стандарта, поскольку предполагает прибавление ОР с номинальной концентрацией к испытуемому образцу [5]. Таким образом, если диапазон метода стандарта составляет (25-125) % от *ImL* (см. выше), то в методе добавок он расширяется до (25-225) %, причем 200 % соответствует стандартному раствору при содержании ОР в испытуемой пробе, равной 100 % от *ImL*. Учитывая, что количество растворов равно 5, для исследования линейности целесообразно использовать модельные растворы с концентрациями 25 %, 75 %, 125 %, 175 %, 225 %.

Как и в методе стандарта (см. выше), модельные растворы готовятся с использованием предварительно высушенного анализируемого вещества (для удаления ОР) в той же концентрации, что и в методике. С использованием высушенного анализируемого вещества готовится и холостой раствор (*0*) — для проверки отсутствия мешающих пиков анализируемого вещества на хроматограмме. Необходимо также получить хроматограмму растворителя (*00*), чтобы убедиться в отсутствии на ней пиков, перекрывающихся с анализируемыми ОР.

Для перевода в нормализованные координаты необходим также еще один раствор со 100 %-ной концентрацией (*st*). В отличие от метода стандарта, он готовится также с использованием анализируемого вещества (как и в реальном анализе методом добавок).

Поскольку чем шире диапазон, тем труднее добиться необходимой линейности и точнос-

ти, в обычной (непарофазной хроматографии) метод добавок менее точен, чем метод стандарта, и его применение обычно нецелесообразно.

1.4. Специфичность: влияние мешающих пиков субстанции и растворителя

При приготовлении модельных растворов для проверки эффектов матрицы необходимо использовать анализируемое вещество. Данное вещество содержит неизвестное количество ОР, что не позволяет приготовить модельные растворы с известными концентрациями ОР. Поэтому для приготовления модельных растворов из субстанции необходимо удалить ОР. Обычно это делают высушиванием в вакууме. Однако и после этого при валидации методики контроля ОР нередко приходится сталкиваться с наличием посторонних пиков, перекрывающихся с пиками анализируемых ОР, что влияет на специфичность методики. Для контроля этих пиков получают хроматограммы холостого раствора (*0*) и растворителя, используемого для анализа (*00*). Посторонние пики мешают проведению валидации, а также самому контролю ОР. Появление мешающих пиков может быть связано со следующими причинами:

1. из анализируемого вещества, высушенного для приготовления модельных растворов, не полностью удаляются ОР, что приводит к завышению фактического содержания ОР в модельных растворах и ухудшению валидационных характеристик;

2. мешающие пики являются пиками примесей растворителя, применяемого для анализа;

3. мешающие пики представляют собой примеси или продукты разложения анализируемого вещества и/или взаимодействия его с растворителем.

1.4.1. Влияние остатков ОР

Случай 1 возникает только на стадии проведения валидации. Он осложняет получение метрологических характеристик, но не сказывается на результатах контроля ОР и принятии решения о качестве. Для нивелирования влияния мешающих пиков (которые являются неудаленными ОР) в этом случае при проведении валидации (но не самого контроля качества) из площадей пиков анализируемых ОР на хроматограммах стандарта (в методе добавок; в методе стандарта — нет) и модельных растворов просто вычитают площади этих ОР на хроматограмме холостого раствора (*0*).

При этом получаемые метрологические характеристики валидируемой методики ухудшаются по сравнению с истинными значениями. Из соотношения (8), в частности, видно, что относительные стандартные отклонения площадей пиков модельных растворов возрастут примерно на столько процентов, сколько процентов составляют в нормализованных координатах площади пиков ОР на хроматограмме холостого раствора (0). Например, если площадь мешающего пика на хроматограмме холостого раствора составляет в нормализованных координатах 10 % от площади пика, соответствующего ImL , то RSD площадей пиков модельных растворов вырастут в 1.1 раза (на 10 %) по сравнению истинными значениями. Однако если при этом выдерживаются рассмотренные выше критерии, то методику можно считать валидированной, поскольку реально ее метрологические характеристики еще лучше.

Доказать, что мешающие пики принадлежат именно неудаленным ОР можно разными способами, например, повторной сушкой анализируемого вещества. Уменьшение мешающих пиков свидетельствует в пользу принадлежности их неудаленным ОР.

1.4.2. Влияние примесей в растворителе и анализируемом веществе

В случаях 2-3 ситуация иная. Эти случаи возникают как на стадии валидации, так и при самом контроле ОР. Поскольку априори мы не знаем величины площадей этих пиков при проведении контроля качества реальных объектов, мы не имеем права вычитать их из площадей пиков модельных растворов и стандарта при проведении валидации.

Наличие мешающих пиков на хроматограмме растворителя (00) свидетельствует о наличии мешающих примесей в растворителе, используемом для анализа (они могут образовываться и в результате разложения растворителя в процессе анализа). Наличие мешающих пиков (не являющихся неудаленными остатками ОР) на хроматограмме холостого раствора свидетельствует о наличии в анализируемом веществе мешающих примесей или образовании их в процессе хроматографирования и взаимодействия с растворителем.

В идеальном случае, на хроматограммах холостого раствора (0) и растворителя (00) мешающие пики должны отсутствовать. Однако на практике они часто присутствуют. Возни-

кает вопрос, как это влияет на проведение валидации и контроля качества, и какие значения площадей этих пиков являются допустимыми.

Мешающие пики характеризуют систематическую погрешность методики анализа (d_j), которая, чтобы не влиять на принятие решений о качестве, должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой неопределенностью методики анализа Δ_{Im} [17], т.е., учитывая (14):

$$\delta_j \leq \max \delta = 0.32 \cdot \Delta_{Im} = 0.32 \cdot 16 = 5.1\%. \quad (18)$$

Мешающие пики растворителя и анализируемого вещества по-разному влияют на проведение валидации и контроля качества в случае метода стандарта и метода добавок.

1.4.2.1. Метод добавок

В методе добавок концентрации анализируемого вещества и растворителя (а, следовательно, и соответствующих им примесей) в испытуемом (или модельном) растворе и стандарте одинаковы. Концентрации же самих анализируемых ОР отличаются на ImL . Для площадей j -ого ОР в испытуемом и стандартном растворах можно записать соотношения:

$$\begin{aligned} S_{ref,j} &= S_{ImL,j} + S_{test,j} = S_{ImL,j} + (S_j + S_{oj}), \\ S_{test,j} &= S_j + S_{oj}. \end{aligned} \quad (19)$$

Здесь индекс «0» относится к холостому раствору, «ref» относится к раствору сравнения, «test» — к испытуемому раствору, « ImL » — к теоретической площади пика, соответствующей ImL , S_j — теоретическая площадь пика, отвечающая фактическому содержанию j -ого ОР в испытуемом растворе.

Систематическая погрешность j -ого ОР (δ_j), вызванная влиянием примесей в растворителе и анализируемом веществе, в фармакопейном методе добавок представляет собой изменение отношения (1) K_{Imp} , вызванное наличием этих примесей. Величина δ_j зависит от концентрации ОР в анализируемом веществе, уменьшаясь с ее ростом. Поскольку мы имеем дело с предельным испытанием, то величину δ_j целесообразно регламентировать для критического случая — когда концентрация ОР в анализируемом веществе равна ImL (т.е. $S_j = S_{ImL,j}$) и теоретическое значение $K_{Imp} = 0.5$. Тогда, учитывая соотношения (1, 18-19), получим для j -ого ОР требования к площади пика ОР на хроматограмме холостого раствора (S_{0j}):

$$\begin{aligned} \delta_j &= \frac{100}{0.5} \cdot \left(\frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} - 0.5 \right) = \\ &= \frac{100}{0.5} \cdot \left(\frac{S_{ImL,j} + S_{oj}}{2 \cdot S_{ImL,j} + S_{oj}} - 0.5 \right) = \\ &= \frac{100 \cdot S_{oj}}{2 \cdot S_{ImL} + S_{oj}} = \frac{100 \cdot S_{oj}}{S_{ref}} \leq \max \delta = 5.1\%. \end{aligned} \quad (20)$$

1.4.2.2. Метод стандарта

В этом случае концентрацию растворителя (и, соответственно, примесей, связанных с ним) в испытуемом и стандартном растворах можно считать одинаковой, но испытуемое вещество (и связанные с ним примеси) присутствует в испытуемом растворе и отсутствует в стандартном. Выражения для площадей пиков j -ого ОР, аналогичные (19), имеют вид (индекс «00» относится к хроматограмме растворителя):

$$\begin{aligned} S_{ref,j} &= S_{ImL,j} + S_{ooj} \\ S_{test,j} &= S_j + S_{oj} \end{aligned} \quad (21)$$

Как и в методе добавок, в методе стандарта систематическая погрешность анализа j -ого ОР (d_j) зависит от концентрации ОР в анализируемом веществе, уменьшаясь с ее ростом. Поэтому ее также целесообразно регламентировать для критического случая — когда концентрация ОР в анализируемом веществе равна ImL (т.е. $S_j = S_{ImL,j}$). В этом случае теоретическое значение отношения площадей ОР на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов равно 1. Поэтому, учитывая соотношения (18, 21), получим, аналогично (20), для j -ого ОР требования к площадям пиков ОР на хроматограммах холостого раствора (S_{oj}) и растворителя (S_{ooj}) в методе стандарта:

$$\begin{aligned} \delta_j &= 100 \cdot \left(\frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} - 1 \right) = \\ &= 100 \cdot \frac{S_{oj} - S_{ooj}}{S_{ref,j}} \leq \max \delta = 5.1\%. \end{aligned} \quad (22)$$

Учитывая соотношения (19) и (21), нетрудно видеть, что метод стандарта для критического случая (содержание ОР в анализируемом веществе равно ImL) и при отсутствии мешающих примесей в растворителе примерно в два раза более чувствителен к мешающим пикам субстанции, чем метод добавок — за счет

в два раза меньшей концентрации стандартного раствора.

1.5. Требования к линейности

Как показано [2], при исследованиях линейности, точности и правильности удобно работать в нормализованных координатах. В случае контроля примесей [3] концентрации выражаются в процентах к предельно допустимой по АНД концентрации примеси ImL (в данном случае ОР), а площадь (или высота) пика выражаются в процентах к площади пика, соответствующей ImL .

Основные регламентируемые характеристики прямой $Y = a + b \cdot X$ — это остаточное стандартное отклонение (RSD_o), коэффициент корреляции (R_c) и свободный член (a).

Остаточное стандартное отклонение RSD_o определяется только неопределенностью методики Δ_{im} и количеством точек прямой (g) [2-3]. В нашем случае $g = 5$, $\Delta_{imp} = 11.3\%$ (см. уравнение (11)), поэтому [2-3]:

$$\begin{aligned} RSD_o &\leq \Delta_{im} / t(95\%, g - 2) = \\ &= 16 / 2.35 = 6.8\% \end{aligned} \quad (23)$$

Требования же к коэффициенту корреляции R_c и свободному члену a зависят от диапазона, который у метода стандарта и метода добавок разный. Поэтому и требования к ним у этих методов разные.

1.5.1. Метод стандарта

1.5.1.1. Коэффициент корреляции

Исследуемые концентрации (25 %, 50 %, 75 %, 100 % и 125 %) характеризуются стандартным отклонением $SD_x = RSD_{range} = 39.53\%$. Как показано [2-3], требования к коэффициенту корреляции в этом случае даются соотношением:

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{RSD_o^2}{RSD_{range}^2}} = 0.9851. \quad (24)$$

1.5.1.2. Требования к свободному члену

1) статистически незначимое отличие от нуля, т.е. при $g = 5$:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \cdot s_a = 2.35 \cdot s_a. \quad (25)$$

2) при невыполнении неравенства (25) (т.е. a — статистически значимо отличается от нуля), должна быть практическая незначимость; в нашем случае, учитывая (12-13), получим в нормализованных координатах [2-3]:

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \Delta_{imp}}{1 - (25/100)} = \frac{0.32 \cdot 16}{0.75} = 6.8\%. \quad (26)$$

1.5.2. Метод добавок

1.5.2.1. Коэффициент корреляции

Исследуемые концентрации (25 %, 75 %, 125 %, 175 % и 225 %) характеризуются стандартным отклонением $SD_x = RSD_{range} = 79.1$ %. Как показано [2-3], требования к коэффициенту корреляции в этом случае даются соотношением:

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{RSD_o^2}{RSD_{range}^2}} = 0.9963. \quad (27)$$

1.5.2.2. Требования к свободному члену

1) Статистически незначимое отклонение от нуля — см. соотношение (25).

2) При невыполнении соотношения (25) свободный член в уравнении $Y = a + b \cdot X$ является статистически значимым, что вызывает систематическую погрешность. Особенно сильно контроля содержания методом добавок является то, что интерес представляет систематическая погрешность не найденной концентрации, а величины K_{Im} из уравнения (1). В нормализованных координатах [2-3] в методе добавок зависимость площади пика от концентрации для испытуемого и стандартного раствора имеет вид ($ImL = 100$ %):

$$Y_{test} = a + b \cdot X_{test},$$

$$Y_{ref} = a + b \cdot (X_{test} + ImL) =$$

$$= a + b \cdot (X_{test} + 100). \quad (28)$$

Учитывая (28), а также требования к систематической погрешности (15), относительная погрешность (δ_a), вносимая свободным членом в расчет отношения (1), равна:

$$\delta_a (\%) = 100 \times$$

$$\times \left[\frac{a + b \cdot X_{test}}{a + b \cdot (X_{test} + 100)} - \frac{X_{test}}{X_{test} + 100} \right] \times$$

$$\times \frac{X_{test} + 100}{X_{test}} = \frac{100 \cdot 100 \cdot a}{Y_{ref} \cdot X_{test}} \leq \max \delta = 5.1. \quad (29)$$

Из соотношения (29) видно, что δ_a уменьшается с ростом концентрации ОР в испытуемом растворе (X_{test}). Используя соотношения (28-29), близость угла наклона b к единице в нормализованных координатах [2], а также невысокое значение остаточного члена a , получим требования к свободному члену в методе добавок при разных концентрациях:

$$X_{test} = 25\% : |a| \leq 1.6\%,$$

$$X_{test} = ImL = 100\% : |a| \leq 2.6\%. \quad (30)$$

Как видно, даже для критического случая $X_{test} = ImL$ метод добавок устанавливает (2.6 %) более чем в 2.5 раза более жесткие требования к практически незначимой [2] величине свободного члена a , чем соотношение (26) метода стандарта (6.8%). Для концентрации же $X_{test} = 25$ % от ImL (именно для этой концентрации, как нижней границы диапазона, приводятся требования (26)) соотношение (30) и вовсе дает нереальное на практике значение $a = 1.6$ %.

Таким образом, в отличие от метода стандарта (26), исключительно жесткие требования (30) к практической незначимости свободного члена a в методе добавок являются бесполезными по сравнению со статистической незначимостью соотношения (25). Это связано с очень большими различиями в площадях испытуемого и стандартного раствора (как минимум, в два раза).

1.6. Правильность и точность

Данные характеристики находятся точно так же, как и для количественного определения — из результатов изучения линейности [2-3].

1.7. Робастность, пригодность хроматографической системы

Специфичность должна быть подтверждена на разных колонках, на которых должны выполняться требования к специфичности п. 1.4.

1.7.1. Стабильность исследуемых растворов

Проверка стабильности исследуемого раствора и раствора сравнения является одним из элементов изучения робастности методики [11] и должна проводиться перед началом всех других валидационных исследований. В случае контроля ОР вопрос изучения стабильности не является таким важным, как для методик количественного определения [2] и, особенно, для методик контроля сопутствующих примесей методом ВЭЖХ [3], поскольку, в отличие от последних, ОР в процессе хранения не накапливаются, а сами ОР обычно достаточно устойчивы. Учитывая это, для подтверждения стабильности растворов можно использовать результаты исследования линейности. Если все модельные растворы готовить одновременно, то время их анализа в несколько раз превышает время анализа испытуемо-

го вещества по АНД. Поэтому выполнение требований по линейности, точности и правильности является и подтверждением достаточной стабильности растворов для контроля ОР по АНД.

В том случае, если нужна стабильность в течение длительного времени, можно использовать тот же подход, что и при контроле сопутствующих примесей [3]: раствор считают устойчивым, если найденное в нем содержание любого из ОР через выбранный промежуток времени отличается от содержания данного ОР в свежеприготовленном растворе не более чем на $\sqrt{2} \cdot \Delta_{Imp}$.

1.8. Пригодность системы

Из полученных данных по изучению линейности можно получить и обоснование требований к пригодности системы по сходимости повторных инъекций. В соответствии со стандартизированной схемой проведения валидации [2-3], каждая точка линейной зависимости получается в условиях АНД с числом параллельных инъекций для каждой точки (модельного раствора), равным n_i (для фармакопейной методики [5] $n_i = 3$), и соответствующим относительным стандартным отклонением RSD_i . Поскольку число точек прямой равно g (в нашем случае $g = 5$), а число параллельных инъекций для раствора сравнения равно n_{ref} (обычно $n_{ref} = 3-5$), то по результатам исследования линейности мы можем получить объединенное относительное стандартное отклонение RSD_{tot} с числом степеней свободы f_{tot} [14]:

$$RSD_{tot} = \sqrt{\frac{(n_{ref}-1) \cdot RSD_{ref}^2 + \sum_{i=1}^g (n_i - 1) \cdot RSD_i^2}{f_{tot}}}, \quad (31)$$

$$f_{tot} = (n_{ref} - 1) + \sum_{i=1}^g (n_i - 1).$$

В частности, для принятого в фармакопейной методике числа параллельных инъекций $n_i = 3$ [5] и рекомендуемого $n_{ref} = 5$, получим $f_{tot} = 14$.

Требования пригодности системы к относительному стандартному отклонению параллельных инъекций можно считать подтвержденными, если все величины RSD_i и RSD_{ref} удовлетворяют требованиям (10, 13), а объединенное относительное стандартное отклонение RSD_{tot} значимо (по Фишеру на уровне 95% [14]) меньше генерального значения $RSD(f = \infty) = 11.9\%$, т.е.:

$$RSD_{tot} \leq RSD(f = \infty) / \sqrt{F(95\%, \infty, f_{tot})},$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 14) \leq 8.2\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 16) \leq 8.4\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 20) \leq 8.8\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 22) \leq 8.9\%. \quad (32)$$

Важной характеристикой пригодности хроматографической системы является также коэффициент разделения (R_s) критической пары пиков. В соответствии с требованиями [4], должно быть $R_s \geq 1.0$, однако разделение до базовой линии отвечает $R_s \geq 1.5$ [9], которое и можно рекомендовать для введения в испытание на пригодность хроматографической системы. При этом для проверки этого критерия берут «наихудший случай». В случае же сильно несимметричных пиков (коэффициент симметрии A_s [4] выходит за рекомендованные пределы 0.8 - 1.5 [9]), величина R_s должна, соответственно, увеличиваться. В частности, для «хвостатых» пиков приблизительное увеличение величины R_s равно $A_s - 1$. Например, для $A_s = 2.5$ можно рекомендовать величину $R_s \geq 1.5 + (2.5 - 1) = 3.0$.

Коэффициент симметрии R_s характеризует специфичность методики, а RSD площадей пиков параллельных хроматограмм — сходимость получаемых результатов. Поэтому требования к ним являются главными требованиями пригодности хроматографической системы.

Кроме того, устанавливаются также общие требования к пригодности системы [4, 9]: коэффициент симметрии A_s должен быть в пределах 0.8 - 1.5, эффективность хроматографической колонки (число теоретических тарелок) должна быть в указанных пределах. Данные величины характеризуют качество хроматографии и не имеют самостоятельного значения. Однако они влияют на коэффициент разделения R_s и RSD площадей пиков параллельных хроматограмм. Если R_s и RSD удовлетворяют необходимым требованиям, требования к этим характеристикам могут быть либерализованы по сравнению с рекомендациями Фармакопеи. При достаточно высокой чувствительности на хроматограмме проявляются пики, вызванные шумом. По этим и другим причинам (вызванным условиями задачи) часто регламентируется также отношение сигнал/шум (обычно $S/N \geq 3-10$) и неучитываемый минимум площади пика (для количественных испытаний обычно $DRL \leq (5-10)\%$, для пре-

дельных испытаний обычно $DRL \leq 32\%$ от ImL) [3].

2. Экспериментальная часть

Для проверки предложенной схемы использовали методику газохроматографического контроля остаточных количеств толуола и изопропанола в новой оригинальной субстанции фенсукцинала. В соответствии с требованиями ГФУ [6], их предельные концентрации не должны превышать 0.089 % и 0.5 %, соответственно.

Используемые реактивы и посуда отвечали требованиям ГФУ [18].

2.1. Валидируемая методика анализа

Условия хроматографирования:

- хроматограф «Хром-5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором,
- колонка стеклянная размером 240 см × 0.3 см; заполненная OV-1, 10 % на «Хроматоне AW DMCS» с размером частиц 0.20-0.25 мм,
- температура колонки — 80 °С;
- температура испарителя — 135 °С;
- температура детектора — 150 °С;
- скорость газа-носителя (аргон) — 30 мл/мин;
- объем пробы 1 мкл, микрошприц М-1Н (Россия).

Порядок выхода ОР: толуол, изопропанол, ДМСО.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- коэффициент симметрии пика [4], рассчитанный по пику толуола из хроматограммы раствора сравнения, составляет не более 2.5;
- коэффициент разделения [4] пиков толуола и изопропанола, рассчитанный из хроматограмм раствора сравнения, составляет не менее 3.0,
- относительное стандартное отклонение [4], рассчитанное для пиков толуола и изопропанола из 5 хроматограмм раствора сравнения, не превышает 9.2 % (см. соотношение (13)),
- эффективность хроматографической колонки [4], рассчитанная по пику толуола на хроматограмме раствора сравнения, составляет не менее 1500 теоретических тарелок.

Валидацию методики проводили для анализа методом стандарта и методом добавок в условиях обычной (непарофазной) хроматографии [4]. При проведении анализа поперемен-

но хроматографировали по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения (растворитель — диметилсульфоксид), получая не менее 3 хроматограмм. Для проверки пригодности предварительно хроматографировали 5 раз раствор сравнения. Для проверки отсутствия в субстанции и растворителе мешающих примесей хроматографировали также раствор субстанции (0) и растворитель (00).

2.2. Приготовление модельных растворов и растворов сравнения

Для приготовления модельных растворов предварительно высушивали субстанцию фенсукцинала в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 4 ч.

Раствор сравнения 00: растворитель (диметилсульфоксид — ДМСО).

Раствор сравнения 0: в мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 1.0 г высушенной субстанции фенсукцинала, растворяли в ДМСО и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Исходный раствор ОР.

А. Во взвешенную мерную колбу вместимостью 10 мл помещали около 0.088 г (точная навеска m_T) толуола, около 0.51 г (точная навеска m_{IP}) изопропанола, доводили объем раствора ДМСО до метки и взвешивали. Находили массу раствора А ($m(A)$).

В. Во взвешенную мерную колбу вместимостью 25 мл помещали около 2.67 г (точная навеска $m_A(B)$) раствора А, доводили объем раствора ДМСО до метки и взвешивали. Находили массу раствора В ($m(B)$). Полученный раствор содержит около 0.8 мг/г толуола и около 4.7 г изопропанола.

Модельные растворы. В мерные колбы вместимостью 10 мл помещали указанные в Табл. 1-2 навески ($m_{B,i}$) исходного раствора В, по 1 г высушенной субстанции фенсукцинала, растворяли и доводили объем раствора ДМСО до метки. Модельные растворы для метода стандарта (25 %, 50 %, 75 %, 100 % и 125 % в теории) и метода добавок (25 %, 75 %, 125 %, 175 % и 225 % в теории) готовятся одинаково.

Раствор сравнения для метода стандарта (MS). Навеску $m_{st}(MS)$ раствора В, соответствующую номинальной концентрации исследуемых ОР в модельных растворах, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора ДМСО до метки.

Раствор сравнения для метода добавок. Навеску $m_{st}(AD)$ раствора В, соответствующую номинальной концентрации исследуемых ОР в модельных растворах, помещали в мерную

колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 1 г высушенной субстанции фенсукцинала и довели объем раствора ДМСО до метки.

Нормализованные концентрации толуола (Т) и изопропанола (IP) в *i*-ом модельном растворе рассчитывали по формуле [2-3]:

$$X_{i,T} \% = X_{i,IP} \% = 100 \cdot 10 \cdot (m_{B,i} / m_{st}), \quad (33)$$

где:

m_{st} — навеска раствора В, взятая для приготовления соответствующего (для метода стандарта или метода добавок) раствора сравнения.

2.3. Результаты хроматографирования

Типичная хроматограмма раствора сравнения для метода стандарта приведена на Рис. 1.

В растворителе (раствор сравнения 00) не были обнаружены какие-либо мешающие пики (см. Табл. 3-4), в растворе высушенной субстанции (раствор сравнения 0) были найдены только остаточные пики изопропанола (которые уменьшались при дальнейшем высушивании). Поэтому из найденных для модельных смесей площадей пиков изопропанола вычитали среднюю площадь пика изопропанола в растворе сравнения 0 (S_{IP}^0). Аналогично поступали и для раствора сравнения для метода добавок. (Для метода стандарта эта операцию не проводили, поскольку в растворе срав-

нения для метода стандарта отсутствует субстанция).

Нормализованные значения площадей (Y_i) толуола (Т) и изопропанола (IP) рассчитывали по формулам [2-3].

Метод стандарта:

$$Y_{i,T}(MS) = 100 \cdot S_{i,T} / S_{i,T}^{st}(MS),$$

$$Y_{i,IP}(MS) = 100 \cdot (S_{i,IP} - S_{IP}^0) / S_{i,IP}^{st}(MS). \quad (34)$$

Метод добавок:

$$Y_{i,T}(AD)\% = 100 \cdot S_{i,T} / S_{i,T}^{st}(AD),$$

$$Y_{i,IP}(MS)\% =$$

$$= 100 \cdot (S_{i,IP} - S_{IP}^0) / [S_{i,IP}^{st}(AD) - S_{IP}^0]. \quad (35)$$

Для выражения найденной концентрации в процентах к введенной рассчитывали величину [2] Z:

$$Z_i \% = 100 \cdot (Y_i / X_i). \quad (36)$$

Результаты хроматографирования исследуемых объектов представлены в Табл. 3-4. Результаты расчетов представлены в Табл. 6. Критерии рассчитаны на основании подхода [2, 3]. Величины RSD_{tot} рассчитывали по формуле (31), а критические значения для них — из соотношения (32).

Расчеты параметров линейной зависимости $Y = b \cdot X + a$ проводили методом наимень-

Таблица 1

Характеристики модельных растворов для метода стандарта
($m_T = 0.0874$ г, $m_{IP} = 0.5177$ г, $m(A) = 10.6729$ г, $m_A(B) = 2.6878$ г, $m(B) = 27.1129$ г)

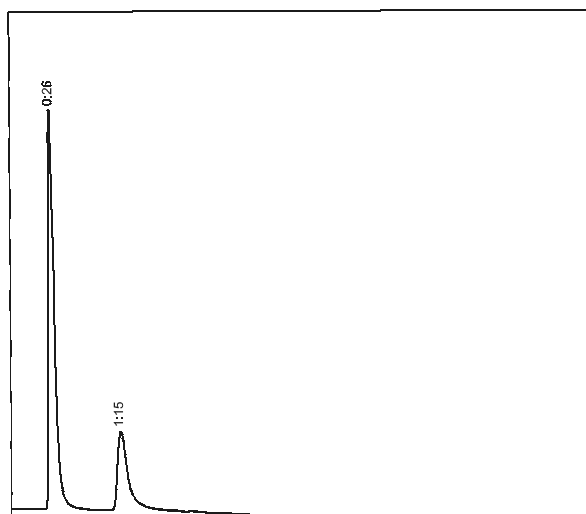
№ р-ра	Масса раствора В, $m_{B,i}$ г	Масса ОР в 10 мл модельного раствора, мг		Нормализованные концентрации, X_i , %	
		Толуол	Изопропанол	Теория	Факт
1	0.2709	0.2298	1.2816	25	24.8
2	0.5446	0.4619	2.5765	50	49.9
3	0.8101	0.6871	3.8331	75	74.2
4	1.0902	0.9247	5.1585	100	99.9
5	1.4169	1.2018	6.7034	125	129.8
<i>st(MS)</i>	1.0913	0.9256	5.1637	-	-

Таблица 2

Характеристики модельных растворов для метода добавок
($m_T = 0.0885$ г, $m_{IP} = 0.5055$ г, $m(A) = 10.7611$ г, $m_A(B) = 2.6659$ г, $m(B) = 27.3783$ г)

№ р-ра	Масса раствора В, $m_{B,i}$ г	Масса ОР в 10 мл модельного раствора, мг		Нормализованные концентрации, X_i , %	
		Толуол	Изопропанол	Теория	Факт
1	0.2728	0.2185	1.2477	25	25.0
2	0.8130	0.6511	3.7183	75	74.4
3	1.3761	1.1020	6.2937	125	125.9
4	1.9184	1.5363	8.7740	175	175.5
5	2.5263	2.0231	11.5543	225	231.1
<i>st(MS)</i>	1.0932	0.8754	4.9999	-	-

Рисунок 1



Типичная хроматограмма раствора сравнения для метода стандарта

ших квадратов [9]. Результаты расчетов - величины b , s_{br} , a , s_{ar} , s_r (остаточное стандартное отклонение) и r (коэффициент корреляции) —

представлены в Табл. 5, полученная в нормализованных координатах прямая — на Рис. 2.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Воспроизводимость параллельных инъекций

Как видно из Табл. 3-4, относительные стандартные отклонения повторных инъекций RSD_i площадей пиков толуола и изопропанола для всех модельных растворов удовлетворяют требованиям (13), т.е. не превосходят 6.7 % и 8.3 % для числа степеней свободы $f = 2$ и 3, соответственно. Объединенное стандартное отклонение RSD_{tot} также не превосходит критических значений соотношения (32). Поэтому требования (10, 13) пригодности хроматографической системы по показателю «относительное стандартное отклонение» можно считать обоснованным.

3.2. Специфичность

На хроматограмме растворителя (раствор сравнения 00) не наблюдалось пиков, имею-

Таблица 3

Результаты хроматографирования модельных растворов методом стандарта

Номер модельного раствора	Площадь пика толуола	Средняя площадь пика $S_{i,T}$ (RSD%)	$Y_{i,T}$ %	Площадь пика изопропанола	Средняя площадь $S_{i,IP}$ (RSD%)	$S_{i,IP} - S_{IP}^0$	$Y_{i,IP}$ %
1	93.2	94.7 1.3 %	24.1	306.8	294.8 3.1 %	240.3	24.3
	96.1			286.4			
	95.3			296.4			
	94.2			289.6			
2	286.0	286.4 6.2 %	73.0	795.7	776.5 5.0 %	722.0	73.0
	304.3			732.0			
	268.9			801.8			
3	486.4	486.6 3.6 %	124.0	1277.9	1294.7 1.3 %	1240.2	125.3
	469.0			1295.3			
	504.5			1310.8			
4	671.6	689.2 2.4 %	175.6	1913.1	1824.9 4.4 %	1770.4	178.9
	691.4			1807.5			
	704.5			1754.2			
5	894.8	889.5 6.6 %	226.6	2527.1	2359.5 6.3 %	2305.0	232.9
	945.2			2306.2			
	828.4			2245.1			
st(MS)	370.8	392.5 6.2 %	-	1104.1	1044.0 4.7 %	989.5	-
	426.3			1065.1			
	392.4			1003.9			
	380.4			1002.9			
раствор сравнения 00 (S_{00})	0			0			
раствор сравнения 0 (S_0)	0			54.2	54.5 1.2 %		
	0			55.2			
	0			54.0			
объединенное RSD_{tot} %		1.8 ($f_{tot} = 13$)			2.9 ($f_{tot} = 15$)		
критическое значение RSD_{tot} %		8.0			8.3		

Таблица 4

Результаты хроматографирования модельных растворов методом добавок

Номер модельного раствора	Площадь пика толуола	Средняя площадь $S_{i,T}$ ($RSD_i\%$)	$Y_{i,T}\%$	Площадь пика изопропанола	Средняя площадь $S_{i,IP}$ ($RSD_i\%$)	$S_{i,IP} - S_{IP}^0$	$Y_{i,IP}\%$
1	93.2 96.1 95.3 94.2	94.7 1.3 %	24.1	306.8 286.4 296.4 289.6	294.8 3.1 %	240.3	24.3
2	286.0 304.3 268.9	286.4 6.2 %	73.0	795.7 732.0 801.8	776.5 5.0 %	722.0	73.0
3	486.4 469.0 504.5	486.6 3.6 %	124.0	1277.9 1295.3 1310.8	1294.7 1.3 %	1240.2	125.3
4	671.6 691.4 704.5	689.2 2.4 %	175.6	1913.1 1807.5 1754.2	1824.9 4.4 %	1770.4	178.9
5	894.8 945.2 828.4	889.5 6.6 %	226.6	2527.1 2306.2 2245.1	2359.5 6.3 %	2305.0	232.9
$st(AD)$	370.8 426.3 392.4 380.4	392.5 6.2 %	-	1104.1 1065.1 1003.9 1002.9	1044.0 4.7 %	989.5	-
раствор сравнения 00 (S_{00})	0			0			
раствор сравнения 0 (S_0)	0 0 0			54.2 55.2 54.0	54.5 1.2 %		
объединенное $RSD_{tot}, \%$		4.8 ($f_{tot} = 14$)			3.4 ($f_{tot} = 16$)		
критическое значение $RSD_{tot}, \%$		8.2			8.4		

этих времена удерживания, совпадающие (или близкие) к временам удерживания пиков толуола и изопропанола.

На хроматограмме раствора сравнения 0 наблюдался пик, совпадающий по времени удерживания с пиком изопропанола. Его площадь ($S_{IP}^0 = 54.5$) составляет 5.2 % площади пика изопропанола раствора сравнения для метода добавок, что превышает требования (20) ($\leq 5.1\%$). Однако площадь данного пика уменьшалась при дальнейшем высушивании, поэтому можно считать, что он является пиком изопропанола, который не полностью удался при высушивании. Поэтому при обработке результатов площадь данного пика вычиталась из площадей пиков изопропанола всех модельных растворов и раствора сравнения для метода добавок, кроме раствора сравнения для метода стандарта.

Коэффициент разделения пиков на всех исследованных хроматограммах превышал 5.5, что соответствует требованиям пригодности системы ($R_s > 3.0$).

Эффективность колонки по пику толуола на всех хроматограммах и колонках превышает 1500 т.т. Поскольку при этом наблюдаются удовлетворительные метрологические характеристики, данная величина и предлагается для введения в испытание на пригодность системы.

Таким образом, специфичность методики можно считать подтвержденной.

3.3. Линейность и предел обнаружения

Как видно из Табл. 5, линейность выполняется для обоих растворителей.

Следует отметить, что, как показано в п. 1.5.2.2., требования практической незначимости свободного члена ($\leq 2.6\%$) являются бесполезными в случае метода добавок.

Предел обнаружения для обоих растворителей удовлетворяет критерию (17) ($\leq 32\%$).

3.4. Правильность и точность

Как видно из Табл. 6, сходимости результатов удовлетворяет требованиям (14) для обоих растворителей. Систематическая погреш-

ность (правильность) ОР удовлетворяет требованиям статистической и практической незначимости [2] для обоих ОР для метода стандарта. В случае метода добавок систематическая погрешность является значимой статистически для толуола, но незначимой практически. Для изопропанола систематическая погрешность является незначимой статистически и практически.

Таким образом, точность удовлетворяет необходимым требованиям для обоих растворителей и обоих подходов.

Кроме того, как показано в п. 1.7.1, выполнение требований по линейности, точности и правильности является и подтверждением достаточной стабильности растворов для контроля ОР по АНД.

Выводы

1. Проведено систематическое рассмотрение вопросов, возникающих при валидации методик контроля остаточных растворителей

в лекарственных средствах методом газовой хроматографии.

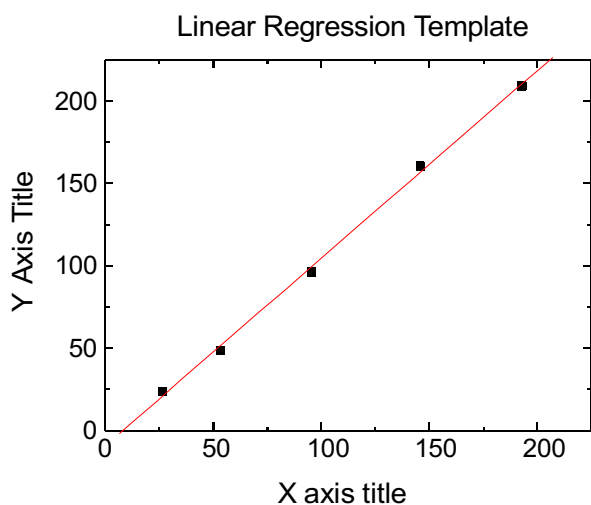
2. Предложена статистически обоснованная стандартизованная процедура валидации таких методик в вариантах метода стандарта и метода добавок.

3. Схема апробирована на примере валидации методики контроля остаточных растворителей в субстанции фенсукцинала методом газовой хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. - 2002. - № 3. - С. 42-50.
2. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения лекарственных средств методом стандарта / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпрудников Ю.В. // Фармаком. - 2004. - № 3. - С. 3-17.
3. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии стандарта / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Загорий В.А. // Фармаком. - 2005. - № 2-3. - С. 78-94.
4. 2.2.28. Газова хроматографія / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. - Харків: ПІРЕГ, 2001. - С. 44-47. - Доповнення 1. - 2004. - С. 27-33.
5. 2.4.24. Ідентифікація залишкових розчинників і контроль їх кількостей // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. - Харків: ПІРЕГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - С. 27-33.
6. 5.4. Залишкові кількості органічних розчинників / Там же. - С. 215-226.
7. 2.4.24. Identification and control of residual solvents // European Pharmacopoeia. - 4th ed., 4.8 - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2004. - P. 96-100.
8. 2.4.24. Identification and control of residual solvents // European Pharmacopoeia. - 5th ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2004. - P. 113-118.
9. 2.2.46. Chromatographic separation techniques // European Pharmacopoeia. - 5th ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2004. - P. 69-73.
10. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения ле-

Рисунок 2



Линейная регрессия для толуола в нормализованных координатах

Таблица 5

Результаты обработки величин X_{ij} и Y_{ij} методом наименьших квадратов по прямой $Y = A + B \cdot X$ (толуол — Т, изопропанол — IP)

ОР	A	SD _A	2.353* SD _A	Практ. незн. A	ΠO ≤ 32%	B	SD _B	RSD _o ≤ 6.8	R ≥ 0.9851
<i>метод стандарта</i>									
Т	0.70	3.48	8.19	2.6	12.0	0.961	0.041	3.41	0.9972
IP	4.30	4.00	9.41	2.6	14.1	1.004	0.048	3.91	0.9966
<i>метод добавок</i>									
Т	-0.27	1.50	3.53	6.8	5.0	0.989	0.010	1.67	0.9998
IP	-1.90	1.36	3.20	6.8	4.4	1.019	0.009	1.52	0.9999

Таблиця 6

Проверка правильности и точности

№	Метод стандарта					Метод добавок				
	X_i	$Y_i(T)$	$Y_i(IP)$	$Z_i(T)$	$Z_i(IP)$	X_i	$Y_i(T)$	$Y_i(IP)$	$Z_i(T)$	$Z_i(IP)$
1	24.8	23.3	25.6	94.0	103.2	25.0	24.1	24.3	96.4	97,2
2	49.9	47.8	51.6	95.8	103.4	74.4	73.0	73.0	98.8	98,3
3	74.2	74.4	75.5	100.3	101.8	125.9	124.0	125.3	99.1	99,5
4	99.9	101.3	103.3	101.4	103.4	175.5	175.6	178.9	100.1	101.9
5	129.8	122.7	125.2	94.5	96.5	231.1	226.6	232.9	96.8	100.8
среднее, \bar{Z} %				97.2	101.7				98.2	99.54
SD , %				3.5	2.9				1.58	1.88
$t(95\%, 3)$				2.13	2.13				2.13	2.13
$\Delta_m (\leq 16\%)$				7.5	6.2				3.37	4.00
систематическая погрешность $\delta = Z - 100 $				2.8	1.7				1.8	0.5
$\Delta_m / \sqrt{5}$				3.3	2.8				1.51	1.8
$max \delta$				5.1	5.1				5.1	5.1
незначимость δ :										
(а) $\delta \leq \Delta_m / \sqrt{5}$:				да	да				нет	да
(б) если не выполняется (а), то $\delta \leq max \delta = 5.1$				да	да				да	да

картвенных средств в разных лабораториях / Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.Н. // Фармаком. - 2004. - № 2 - С. 20 - 34.

11. Валідація аналітичних методик і випробувань^N // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001. - С. 58-67. - Доповнення 1. - 2004. - С. 2-4.

12. Фармакопейные аспекты методики определения молекулярно-массового распределения в субстанции декстран 40 и готовом лекарственном препарате «Реополиглюкин» / Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Поддружинов Ю.В., Иванов Л.В. // Фармаком. - 2004. - № 1. - С. 3-21.

13. Стандартизация хроматографического анализа лекарственных средств. Сообщение 1. Метрологические аспекты применения высокоэффективной жидкостной хроматографии / Гризодуб А.И., Левин М.Г., Леонтьев Д.А., Георгиевский В.П. // Фармаком. - 1995. - № 7. - С. 8-19.

14. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - С. 187-214.

15. Daas A.G.J., Miller J.H.McB. Relationship Between Content Limits, System Suitability for Precision and Acceptance/Rejection Criteria for Assays Using Chromatographic Methods // Pharmeuropa. - 1999. - Vol.11, No. 4. - P. 571-577.

16. Воспроизводимость фармакопейных методик ВЭЖХ при количественном определении лекарственных средств в разных лабораториях: роль неопределенности пробоподготовки / Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Архипова Н.Н., Зволинская Н.Н., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. // Фармаком. - 2003. - № 4. - С. 4-12.

17. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Физиологично активні речовини. - 2001. - № 1 (31). - С. 32-44.

18. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». -

1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001. - 556 с. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.

Резюме

Гризодуб О.І., Губаревич І.Г., Карпова Т.О., Нікішина Л.С., Леонтьєв Д.А.

Стандартизована процедура валідації методик контролю залишкових розчинників у лікарських засобах методом газової хроматографії

Проведено систематичний розгляд питань, що виникають за валідації методик контролю залишкових розчинників у лікарських засобах методом газової хроматографії. Запропоновано статистично обґрунтовану процедуру валідації таких методик у варіантах методу стандарту та методу добавок. Схему апробовано на прикладі валідації методики контролю залишкових розчинників у субстанції фенсукциналу методом газової хроматографії.

Summary

Gryzodub A.I., Gubarevich I.G., Karpova T.A., Nikishina L.Ye., Leontyev D.A.

Standardized procedure of validation of methods of residual solvents control by gas chromatography

Systematic consideration of problems, appeared at the validation of methods of residual solvents control in drugs by gas chromatography was conducted. Statistically valid standardized procedure of validation of such methods in variants of the method of standard and the method of additions was suggested. The plan was approved by the example of validation of the method of residual solvents by gas chromatography control procedure in fensuccinal substance.

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).

Губаревич Ирина Георгиевна. Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1984). Мл. науч. сотр. лаборатории аналитических и физико-химических исследований института патологии эндокринных заболеваний им. В.Я. Данилевского АМН Украины.

Карпова Татьяна Алексеевна. Окончила химический факультет Харьковского государственного университета (1973). Науч. сотр. лаборатории аналитических и физико-химических исследований института патологии эндокринных заболеваний им. В.Я. Данилевского АМН Украины.

Никишина Людмила Евгеньевна. Окончила химический факультет Харьковского государственного

университета (1971). К.х.н. (1976). Зав. лаб. аналитических и физико-химических исследований института патологии эндокринных заболеваний им. В.Я. Данилевского АМН Украины.

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).

До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України

До Вашої уваги представлені проекти монографій Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України 1-го видання на рослинні олії.

Проекти монографій надані 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».

В обговоренні проектів брали участь Гризодуб О.І. (д.х.н., професор, заступник директора ДП НЕФЦ із наукової роботи), Зинченко О.А. (в.о. зав. лабораторії ДП НЕФЦ), Котов А.Г. (к.фарм.н., ст.наук.співр. сектора природних гетероциклічних сполук ДП ДНЦЛЗ), Котова Е.Е. (наук.співр. лабораторії фармакопейного аналізу НП НЕФЦ).

Зауваження та пропозиції щодо представлених проектів Ви можете направляти на адресу ДП «Науково-експертний фармакопейний центр» (відділ ДФУ) або журналу «Фармаком».

Запрошуємо всіх зацікавлених осіб до відкритого обговорення на Форумі сайту журналу «Фармаком» Farmacom.narod.ru.

ПРОЕКТ

Випробовуваний розчин. 1 г субстанції розчиняють у толуолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 10 мкл ліналолу *P*, 30 мкл анісового альгерігу *P* і 200 мкл анетолу *P* розчиняють у толуолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 15 мл. 1 мл одержаного розчину доводять толуолом *P* до об'єму 5 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} *P*.

Рухома фаза: етилацетат *P* - толуол *P* (7:93).

Об'єм проби, що наноситься: 5 мкл смугами завдовжки 10 мм (для звичайної ТШХ пластинки) або 2 мкл смугами завдовжки 10 мм (для пластинок із дрібним розміром часток).

Відстань, яку має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту (для звичайної ТШХ пластинки) або 6 см (для пластинки із дрібним розміром часток).

Висушування: на повітрі.

АНИСОВА ОЛІЯ

Anisi aetheroleum

ANISE OIL

Ефірна олія, одержана із висушених стиглих плодів *Pimpinella anisum* L. методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна або блідо-жовтого кольору рідина.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: **В.**

Друга ідентифікація: **А.**

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

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

Результати А: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися й інші зони.

Верхня частина пластинки	
Анетол: зона поглинання	Зона дуже інтенсивного поглинання (анетол)
Анісовий альдегід: зона поглинання	Зона поглинання Зона поглинання (анісовий альдегід)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Виявлення В: пластинку обприскують реактивом метил 4-ацетилбензоату Р і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв; переглядають гарячу пластинку при денному світлі не пізніше ніж через 5 хв.

Результати В: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися й інші зони.

Верхня частина пластинки	
Анетол: коричнева зона	Фіолетово-коричнева зона (монотерпенів гідрокарбонати) (фронт розчинника) Дуже насичена коричнева зона (анетол), чітко відділена
Анісовий альдегід: жовта зона	Сіра зона Жовта зона (анісовий альдегід)
Ліналол: сіра зона	Сіра зона (ліналол) Сіра зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль.

Нормування: характерні піки на хроматограмі випробовуваного розчину повинні мати той самий час утримування, що і на хроматограмі розчину порівняння.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 0.980 до 0.990.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.552 до 1.561.

Температура тверднення (2.2.18). Від 15 °С до 19 °С.

Фенхон. Газова хроматографія (2.2.28). Хроматографування проводять за умов, описаних у випробуванні на хроматографічний профіль, із такими змінами.

Випробовуваний розчин. 400 мкл субстанції розчиняють у 2.0 мл гексану Р.

Розчин порівняння (а). 10 мкл фенхону Р доводять гексаном Р до 1.2 г.

Розчин порівняння (б). 100 мкл розчину порівняння (а) доводять гексаном Р до об'єму 100 мл.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):

— **відношення сигнал/шум:** не менше 10 для основного піка.

Нормування:

— **фенхон:** не більше 0.01 %.

Фенікулін. Газова хроматографія (2.2.28). Хроматографування проводять за умов, описаних у випробуванні на хроматографічний профіль, із такими змінами.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння (а). 10 мг випробовуваного розчину доводять гексаном Р до 1.000 г. 0.5 мл одержаного розчину доводять гексаном Р до об'єму 100 мл.

Розчин порівняння (б). ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка.

Придатність хроматографічної системи:

— хроматограма розчину порівняння (б) має відповідати хроматограмі, що прикладається до ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка,

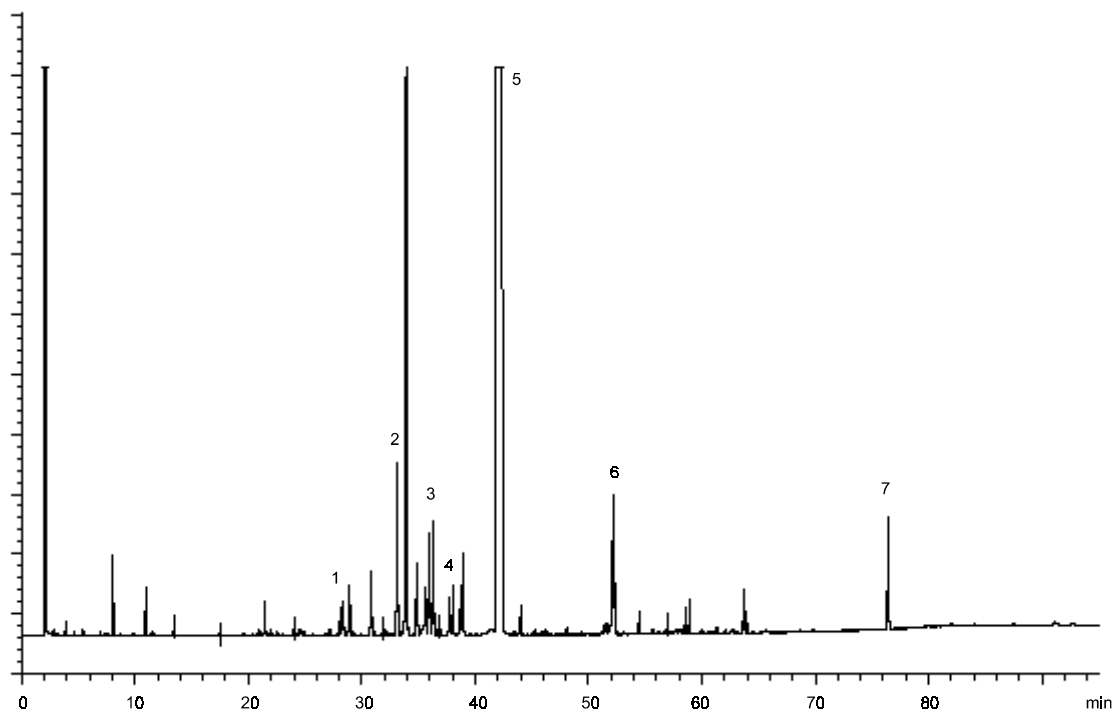
— **відношення сигнал/шум:** не менше 10 для основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

Нормування: положення піка фенікуліну має відповідати хроматограмі, що прикладається до ФСЗ фенікуліну для ідентифікації піка.

— **фенікулін:** не більше 0.01 %.

Жирні олії й осмолени ефірні олії (2.8.7). Субстанція має витримувати випробування на жирні олії й осмолени ефірні олії.

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.



1. ліналол 3. α -терпінеол 5. *транс*-анетол 7. псевдоізоевгеніл 2-метилбутират
2. естрагол 4. *цис*-анетол 6. анісовий альдегід

Рисунок 0804.-1. — Хроматограма, одержана у випробуванні на хроматографічний профіль анісової олії

Випробовуваний розчин. 200 мкл субстанції розчиняють в 1.0 мл гексану Р.

Розчин порівняння. До 1.0 мл гексану Р додають 20 мкл ліналолу Р, 20 мкл естраголу Р, 20 мкл α -терпінеолу Р, 60 мкл анетолу Р і 30 мкл анісового альдегіду Р.

Колонка:

- матеріал: кварц,
- розмір: 30 м × 0.25 мм,
- нерухома фаза: макрогол 20000 Р (товщина шару 0.25 мкм).

Газ-носіє: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.0 мл/хв.

Погіл потоку: 1:100.

Температура:

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 – 5	60
	5 – 80	60 → 210
	80 – 95	210
Блок вводу проб		200
Детектор		220

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0.2 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 1.5 між піками естраголу та α -терпінеолу.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину та положення *цис*-анетолу та псевдоізоевгеніл 2-метилбутирату на хроматограмі, наведеній на Рисунку 0804.-1 (не враховують пік гексану).

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- ліналол: менше 1.5 %,
- естрагол: від 0.5 % до 5.0 %,
- α -терпінеол: менше 1.2 %,
- *цис*-анетол: від 0.1 % до 0.4 %,
- *транс*-анетол: від 87 % до 94 %,
- анісовий альдегід: від 0.1 % до 1.4 %,
- псевдоізоевгеніл 2-метилбутират: від 0.3 % до 2.0 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С.

ПРОЕКТ

АРАХІСОВА ОЛІЯ ГІДРОГЕНІЗОВАНА

Arachidis oleum hydrogenatum

ARACHIS OIL, HIDROGENATED

Арахісову олію гідрогенізовану одержують шляхом очищення, освітлення, гідрогенізації та дезодорації олії, одержаної з лущеного насіння *Arachis hypogaea* L. Тип гідрогенізованої арахісової олії визначається певним номінальним значенням температури краплепадіння.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. М'яка маса білого або слабко-жовтуватого кольору, що при нагріванні розплавляється до прозорої рідини блідо-жовтого кольору.

Розчинність. Практично не розчинна у воді *P*, легко розчинна у метиленхлориді *P* і петролейному ефірі *P* (температура кипіння: від 65 °С до 70 °С), дуже мало розчинна у 96 % спирті *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: **А, В.**

Друга ідентифікація: **А, С.**

А. Субстанція має витримувати випробування «Температура краплепадіння», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

В. Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). Одержана хроматограма має бути порівнянною з типовою хроматограмою арахісової олії.

С. Субстанція має витримувати випробування «Жирнокислотний склад».

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Температура краплепадіння (2.2.17). Від 32 °С до 43 °С. У цих межах температура краплепа-

діння не має відрізнятися більше ніж на 3 °С від номінального значення.

Кислотне число (2.5.1). Не більше 0.5. 10.0 г субстанції розчиняють у 50 мл зазначеного розчинника при нагріванні на водяній бані.

Перекисне число (2.5.5). Не більше 5.0. 5.0 г субстанції розчиняють у 30 мл зазначеного розчинника при нагріванні на водяній бані.

Неомильовані речовини (2.5.7). Не більше 1.0 %.

Лужні домішки (2.4.19). Субстанція має витримувати випробування на лужні домішки у жирних оліях.

Жирнокислотний склад (2.4.22, метод А).

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

- колонка кварцова капілярна розміром 25 м × 0.25 мм, покрита шаром полі(ціанопріл)силоксану *P* завтовшки 0.2 мкм;
- температуру колонки витримують на рівні 180 °С протягом 20 хв;
- температура блока вводу проб і детектора 250 °С;
- газ-носії гелій для хроматографії *P*;
- лінійна швидкість газу-носія 0.7 мл/хв;
- поділ потоку 1:100.

Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- насичені жирні кислоти із довжиною ланцюга менше C_{14} : не більше 0.5 %,
- міристинова кислота: не більше 0.5 %,
- пальмітинова кислота: від 7.0 % до 16.0 %,
- стеаринова кислота: від 3.0 % до 19.0 %,
- олеїнова кислота та ізомери ($C_{18:1}$, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопріл)силоксані від 18.5 до 18.8): від 54.0 % до 78.0 %,
- ліолева кислота та ізомери ($C_{18:2}$, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопріл)силоксані від 19.4 до 19.8): не більше 10.0 %,
- арахідонова кислота: від 1.0 % до 3.0 %,
- ейкозанова кислота: ($C_{20:1}$, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопріл)силоксані від 20.4 до 20.7): не більше 2.1 %,
- бегенова кислота: від 1.0 % до 5.0 %,
- ерукова кислота та ізомери ($C_{22:1}$, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопріл)силоксані від 22.4 до 22.6): не більше 0.5 %,

— лігноцеринова кислота: від 0.5 % до 3.0 %.

Нікель. Не більше 0.0001 % (1 ppm) Ni. Визначення проводять методом атомно-абсорбційної спектроскопії (2.2.23, метод II).

Випробовуваний розчин. 5.0 г субстанції поміщають у попередньо прожарений і зважений платиновий або фарфоровий тигель. Обережно нагрівають і поміщають у субстанцію гніт зі скрученого знезоленого фільтрувального паперу. Запалюють гніт і після запалення субстанції припиняють нагрівання. Після згоряння спалюють у муфельній печі при температурі близько 600 °С до утворення білої золи. Після охолодження залишок за допомогою двох порцій, по 2 мл кожна, кислоти хлористоводневої розведеної Р переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 0.3 мл кислоти азотної Р і доводять об'єм розчину водою Р до 25.0 мл.

Розчини порівняння. Готують три розчини порівняння додаванням до 2.0 мл випробовуваного розчину 1.0 мл, 2.0 мл і 4.0 мл еталонного розчину нікелю (0.2 ppm Ni) і доведенням об'ємів розчинів водою Р до 10.0 мл.

Вимірюють поглинання за довжини хвилі 232 нм, використовуючи як джерело випромінювання лампу з порожнистим нікелевим катодом, графітову піч як генератор атомної пари та аргон Р як газ-носіє.

Вода (2.5.12). Не більше 0.3 %. Визначення проводять із 1.000 г субстанції напівмікрометодом.

ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

МАРКУВАННЯ

Зазначають номінальне значення температури краплепадиння.

ПРОЕКТ

**АРАХІСОВА ОЛІЯ
РАФІНОВАНА**

Arachidis oleum raffinatum

ARACHIS OIL, REFINED

Арахісову олію рафіновану одержують із лущеного насіння *Arachis hypogaea* L. Може бути доданий підходящий антиоксидант.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, в'язка рідина жовтавого кольору.

Розчинність. Дуже мало розчинна у 96 % спирті Р, змішується з петролейним ефіром Р.

(Відносна густина: близько 0.915.

Твердіє при температурі близько 2 °С.)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). Одержана хроматограма має бути порівнянною з типовою хроматограмою арахісової олії.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Кислотне число (2.5.1). Не більше 0.5. Визначення проводять із 10.0 г субстанції.

Перекисне число (2.5.5). Не більше 5.0.

Неомилювані речовини (2.5.7). Не більше 1.0 %. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Лужні домішки (2.4.19). Субстанція має витримувати випробування на лужні домішки у жирних оліях.

Жирнокислотний склад. Газова хроматографія (2.4.22, метод А).

Розчин порівняння (а). Готують 0.50 г суміші речовин, застосовуваних для калібрування, як зазначено в Таблиці 0263.-1. Одержану суміш розчиняють у гептані Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

Таблиця 0263.-1

Речовини, застосовувані для калібрування	Склад (% м/м)
Метилпальмітат Р	10
Метилстеарат Р	5
Метилолеат Р	40
Метиллінолеат Р	25
Метилліноленат Р	2
Метиларахідат Р	5
Метилейкозеноат Р	3
Метилбегенат Р	5
Метилерукат Р	2
Метиллігноцерат Р	3

Склад фракції жирних кислот має бути таким: — насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше C₁₆; не більше 0.4 %,

- *пальмітинова кислота*: від 7.0 % до 16.0 %,
- *стеаринова кислота*: від 1.3 % до 6.5 %,
- *олеїнова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.3): від 35.0 % до 72.0 %,
- *лінолева кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.9): від 13.0 % до 43 %,
- *ліноленова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 19.7) не більше 0.6 %,
- *арахідонова кислота*: від 0.5 % до 3.0 %,
- *ейкозанова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 20.3): від 0.5 % до 2.1 %,
- *бегенова кислота*: від 1.0 % до 5.0 %,
- *ерукова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 22.3): не більше 0.5 %,
- *лігноцерінова кислота*: від 0.5 % до 3.0 %.

Вода (2.5.12). Не більше 0.3 %. Визначення проводять із 3.00 г субстанції, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці.

МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- у необхідних випадках: субстанція придатна для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування,
- назву та концентрацію доданого антиоксиданта.

ПРОЕКТ

БАВОВНІЯНА ОЛІЯ ГІДРОГЕНІЗОВАНА

Gossypii oleum hydrogenatum

COTTONSEED OIL, HIDROGENATED

Бавовняну олію гідрогенізовану одержують шляхом очищення та гідрогенізації олії, одержаної із насіння рослин, що культивуються, різних різновидів *Gossypium hirsutum* L. або інших видів *Gossypium*. Олія містить переваж-

но тригліцериди пальмітинової та стеаринової кислот.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Маса або порошок білого кольору, що при нагріванні розплавляється до прозорої рідини блідо-жовтого кольору.

Розчинність. Практично не розчинна у *воді P*, легко розчинна у *метиленхлориді P* і *толуолі P*, дуже мало розчинна у *96 % спирті P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. Субстанція має витримувати випробування «Температура плавлення», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

B. Субстанція має витримувати випробування «Жирнокислотний склад».

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Температура плавлення (2.2.14). Від 57 °C до 70 °C.

Кислотне число (2.5.1). Не більше 0.5. 10.0 г субстанції розчиняють у 50 мл гарячої суміші рівних об'ємів *96 % спирту P* і *толуолу P*, попередньо нейтралізованої *0.1 M розчином калію гідроксиду*, використовуючи як індикатор *0.5 мл розчину фенолфталеїну P1*. Одержаний розчин титрують відразу ще гарячим.

Перекисне число (2.5.5). Не більше 5.0.

Неомилювані речовини (2.5.7). Не більше 1.0 %. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Лужні домішки. 2.0 г субстанції розчиняють у суміші 1.5 мл *96 % спирту P* і 3 мл *толуолу P*, обережно нагріваючи. До одержаного розчину додають 0.05 мл розчину 0.4 г/л *бромфенолового синього P* у *96 % спирті P*; жовте забарвлення має з'явитися при додаванні не більше 0.4 мл *0.01 M розчину кислоти хлористоводневої*.

Жирнокислотний склад (2.4.22, метод A).

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

- колонка кварцова каплярна розміром 25 м × 0.25 мм, покрита шаром *полі(ціанопропіл)силоксану P* завтовшки 0.2 мкм;

- температуру колонки витримують на рівні 180 °С протягом 35 хв;
- температура блока вводу проб і детектора 250 °С;
- газ-носії *гелій для хроматографії Р*;
- лінійна швидкість газу-носія 0.65 мл/хв;
- поділ потоку 1:100.

Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- *насичені жирні кислоти із довжиною ланцюга менше C₁₄*: не більше 0.2 %,
- *міристинова кислота*: не більше 1.0 %,
- *пальмітинова кислота*: від 19.0 % до 26.0 %,
- *стеаринова кислота*: від 68.0 % до 80.0 %,
- *олеїнова кислота та ізомери (C_{18:1}, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопропіл)силоксані від 18.5 до 18.8)*: не більше 4.0 %,
- *лінолева кислота та ізомери (C_{18:2}, еквівалент довжини ланцюга на полі(ціанопропіл)силоксані від 19.4 до 19.8)*: не більше 1.0 %,
- *арахідонова кислота*: не більше 1.0 %,
- *бегенова кислота*: не більше 1.0 %,
- *лігноцеринова кислота*: не більше 0.5 %.

Нікель. Не більше 0.0001 % (1 ppm) Ni. Визначення проводять методом атомно-абсорбційної спектроскопії (2.2.23, метод II).

Випробовуваний розчин. 5.0 г субстанції поміщають у попередньо прожарений і зважений платиновий або фарфоровий тигель. Обережно нагрівають і поміщають у субстанцію гніт зі скрученого знезоленого фільтрувального паперу. Запалюють гніт і після запалення субстанції припиняють нагрівання. Після згоряння спалюють у муфельній печі при температурі близько 600 °С до утворення білої золи. Після охолодження залишок за допомогою двох порцій, по 2 мл кожна, *кислоти хлористоводневої розведеної Р* переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 0.3 мл *кислоти азотної Р* і доводять об'єм розчину *водою дистильованою Р* до 25.0 мл.

Розчини порівняння. Готують три розчини порівняння додаванням до 2.0 мл випробовуваного розчину 1.0 мл, 2.0 мл і 4.0 мл *еталонного розчину нікелю (0.2 ppm Ni)* і доведенням об'ємів розчинів *водою дистильованою Р* до 10.0 мл.

Вимірюють поглинання за довжини хвилі 232 нм, використовуючи як джерело випромінювання лампу з порожнистим нікелевим катодом, графітову піч як генератор атомної пари та *аргон Р* як газ-носії.

ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

ПРОЕКТ

ГВОЗДИЧНА ОЛІЯ

Caryophylli floris aetheroleum

CLOVE OIL

Гвоздична олія одержана із висушених квіткових пуп'янків *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry (*Eugenia caryophyllus* C. Spreng. Bull. et Harr.) методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора рідина жовтого кольору, що під впливом повітря стає коричневою.

Розчинність. Змішується із *метиленхлоридом Р*, *толуолом Р* і жирними оліями.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.

Друга ідентифікація: А.

А. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи як тонкий шар підхожий силікагель із флуоресцентним індикатором з оптимальною інтенсивністю поглинання за довжини хвилі 254 нм.

Випробовуваний розчин. 20 мкл субстанції розчиняють у 2.0 мл *толуолу Р*.

Розчин порівняння. 15 мкл *евгенолу Р* і 15 мкл *ацетилевгенолу Р* розчиняють у 2.0 мл *толуолу Р*.

На лінію старту хроматографічної пластинки смугами наносять 20 мкл випробовуваного розчину та 15 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у ненасичену камеру і хроматографують, використовуючи як рухому фазу *толуол Р*. Коли фронт розчинника пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, витримують протягом 5 хв і повторюють хроматографування у тих самих умовах. Потім пластинку виймають із камери, сушать на повітрі, переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм і відмічають зони поглинання.

На хроматограмі випробовуваного розчину у середній частині має виявлятися зона поглинання (евгенол) на рівні зони поглинання на хроматограмі розчину порівняння; безпосередньо нижче зони поглинання евгенолу має виявлятися зона слабого поглинання (ацетилевгенол) на рівні зони ацетилевгенолу на хроматограмі розчину порівняння.

Пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р і переглядають при денному світлі при нагріванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв.

На хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння мають виявлятися зони евгенолу інтенсивного коричнювато-фіолетового кольору; на хроматограмі випробовуваного має виявлятися зона ацетилевгенолу слабо-фіолетово-блакитного кольору.

На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися інші забарвлені зони, переважно зона слабо-червоного кольору у нижній частині та зона червонувато-фіолетового кольору (β-каріофілен) у верхній частині.

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль. Часи утримування трьох основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати із часами утримування трьох основних піків на хроматограмі розчину порівняння.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 1.030 до 1.063.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.528 до 1.537.

Кут оптичного обертання (2.2.7). Від 0° до -2°.

Жирні олії й осмолені ефірні олії (2.8.7). Субстанція має витримувати випробування на жирні олії й осмолені ефірні олії.

Розчинність у спирті (2.8.10). 1.0 мл субстанції має розчинятися у 2.0 мл або більше спирту (70 % об/об) Р.

Хроматографічний профіль. Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

Випробовуваний розчин. 0.2 г субстанції розчиняють у 10 г гексану Р.

Розчин порівняння. 7 мг β-каріофілену Р, 80 мг евгенолу Р і 4 мг ацетилевгенолу Р розчиняють у 10 г гексану Р.

Хроматографування проводять на газовому хроматограмі із полуменевіо-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна розміром 60 м × 0.25 мм, покрита шаром макроголу 20000 Р,
- газ-носіє гелій для хроматографії Р,
- лінійна швидкість газу-носія 1.5 мл/хв,
- поділ потоку 1:100.

Витримують температуру колонки 60 °С протягом 8 хв, потім підвищують температуру зі швидкістю 3 °С/хв до 180 °С, температуру 180 °С витримують протягом 5 хв. Температура блока вводу проб і детектора 270 °С.

Хроматографують близько 1.0 мкл розчину порівняння. Порядок виходу піків має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо число теоретичних тарілок, розраховане для піка β-каріофілену при температурі 110 °С становить не менше 30000, коефіцієнт розділення піків евгенолу та ацетилевгенолу становить не менше 1.5.

Хроматографують 1.0 мкл випробовуваної субстанції. Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину. Не враховують пік розчинника.

Визначають вміст кожного із трьох компонентів, у відсотках, методом внутрішньої нормалізації.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- β-каріофілен: від 5.0 % до 14.0 %,
- евгенол: від 75.0 % до 88.0 %,
- ацетилевгенол: від 4.0 % до 15.0 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла та нагрівання місці.

ПРОЕКТ

ЕВКАЛІПТОВА ОЛІЯ

Eucalypti aetheroleum

EUCALYPTUS OIL

Евкалиптова олія одержана зі свіжого листя або верхівкових пагонів різних видів *Eucalyptus* із високим вмістом 1,8-цинеолу методом перегонки з водяною парою та ректифікацією. Переважно використовують такі види: *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker і *Eucalyptus smithii* R.T. Baker.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Безбарвна або блідо-жовтого кольору рідина з ефіроолійним і камфорним запахом та камфорним смаком.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.
Друга ідентифікація: А.

А. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю *P*.

Випробовуваний розчин. 0.1 г субстанції розчиняють у толуолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 50 мкл цинеолу *P* розчиняють у толуолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки смугами наносять 10 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішню розчинників *етилацетат P - толуол P* (10:90). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі, обприскують *розчином анісового альдегіду P* і переглядають при денному світлі при нагріванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв.

На хроматограмі розчину порівняння у середній частині має виявлятися зона, відповідна цинеолу. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна зона на рівні зони цинеолу на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за забарвленням.

Можуть виявлятися інші слабо забарвлені зони.

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль. Часи утримування 5 основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати із часами утримування 5 основних піків на хроматограмі розчину порівняння.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 0.906 до 0.927.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.458 до 1.470.

Оптичне обертання(2.2.7). Від 0° до +10°.

Розчинність у спирті (2.8.10). Субстанція розчинна у 5 об'ємах спирту (70 % об/об) *P*.

Альдегіди. 10 мл субстанції поміщають у пробірку діаметром 25 мм і заввишки 150 мм із притертою скляною пробкою, додають 5 мл толуолу *P* і 4 мл гідроксиламіну розчину спиртового *P*, ретельно струшують і відразу титрують 0.5 *M* розчином калію гідроксиду у спирті (60 % об/об) до переходу червоного забарвлення у жовте. Продовжують титрувати при струшуванні; кінцева точка титрування досягається, коли чисте жовте забарвлення зберігається у нижньому шарі при ретельному струшуванні протягом 2 хв та розділенні шарів. Титрування проводять протягом близько 15 хв. Повторюють титрування, використовуючи інші 10 мл випробовуваної субстанції та відтитровану рідину від першого визначення, в яку додано 0.5 мл 0.5 *M* розчину калію гідроксиду у спирті (60 % об/об) як розчин порівняння для визначення кінцевої точки титрування. У другому титруванні має бути витрачено не більше 2.0 мл 0.5 *M* розчину калію гідроксиду у спирті (60 % об/об).

Хроматографічний профіль. Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння. 80 мкл α -пінену *P*, 10 мкл β -пінену *P*, 10 мкл сабінену *P*, 10 мкл α -феландрену *P*, 10 мкл лімонену *P*, 0.8 мл цинеолу *P* і 10 мг камфори *P* розчиняють у 10 мл ацетону *P*.

Хроматографування проводять на газовому хроматограмі із полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова розміром 60 м × 0.25 мм, покрита шаром макроглоу 20000 P,
- газ-носії гелій для хроматографії P,
- лінійна швидкість газу-носія 1.5 мл/хв,
- поділ потоку 1:100.

Витримують температуру колонки 60 °С протягом 5 хв, потім підвищують температуру зі швидкістю 5 °С/хв до 200 °С, температуру 200 °С витримують протягом 5 хв. Температуру блока вводу проб і детектора 220 °С.

Хроматографують близько 0.5 мкл розчину порівняння. При хроматографуванні за зазначених умов порядок виходу піків має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо число теоретичних тарілок, розраховане для піка лімонену при температурі 110 °С становить не менше 30000; коефіцієнт розділення піків лімонену та цинеолу становить не менше 1.5.

Хроматографують 0.5 мкл випробовуваного розчину. Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст компонентів методом внутрішньої нормалізації.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- α -пінен: від слідових кількостей до 9.0 %,
- β -пінен: менше 1.5 %,
- сабінен: менше 0.3 %,
- α -феландрен: менше 1.5 %,
- лімонен: від слідових кількостей до 12.0 %,
- 1,8-цинеол: не менше 70.0 %,
- камфора: менше 0.1 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С.

КОРИЦІ КИТАЙСЬКОЇ ОЛІЯ

Cinnamomi cassiae aetheroleum

CASSIA OIL

Кориці китайської олія одержана із листя та молодих гілок *Cinnatomum cassia* Blume (*C. aromaticum* Nees) методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, рухома рідина від жовтого до червонувато-коричневого кольору, із характерним запахом коричневого альдегіду.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.

Друга ідентифікація: А.

А. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю P.

Випробовуваний розчин. 0.5 г субстанції розчиняють в ацетоні P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 50 мкл транс-коричного альдегіду P, 10 мкл евгенолу P і 10 мг кумарину P розчиняють в ацетоні P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки смугами наносять 10 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішню розчинників метанол P - толуол P (10:90). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися зона блакитної флуоресценції на рівні зони такого ж кольору на хроматограмі розчину порівняння (кумарин).

Пластинку обприскують розчином анісового альдегіду P і переглядають при денному світлі при нагрівання при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв.

На хроматограмі розчину порівняння у її верхній частині має виявлятися фіолетова

зона (евгенол) і вище неї — зеленувато-блакитна зона (*транс*-коричний альдегід). На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися зона на рівні зони *транс*-коричного альдегіду на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за забарвленням, і може виявлятися дуже слабко забарвлена зона, відповідна евгенолу. Можуть виявлятися інші слабо забарвлені зони.

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль. Часи утримування основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати із часами утримуванні основних піків на хроматограмі розчину порівняння. Пік, відповідний евгенолу, може бути відсутнім на хроматограмі випробовуваного розчину.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 1.052 до 1.070.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.600 до 1.614.

Оптичне обертання(2.2.7). Від -1° до $+1^\circ$.

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28).

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння. 100 мкл *транс*-коричного альдегіду Р, 10 мкл *цинамілацетату* Р, 10 мкл *евгенолу* Р, 20 мг *кумарину* Р і 10 мкл *транс*-2-метоксикоричного альдегіду Р розчиняють в 1 мл *ацетону* Р.

Хроматографування проводять на газовому хроматограмі із полуменевіо-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова розміром 60 м × 0.25 мм, покрита шаром макроглоу 20000 Р,
- газ-носії *гелій для хроматографії* Р,
- лінійна швидкість газу-носія 1.5 мл/хв,
- поділ потоку 1:100.

Використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°С)	Швидкість підвищення температури (°С/хв)	Примітки
Колонка	0 - 10	60	-	ізотермічний режим лінійний градієнт
	10 - 75	60 → 190	2	
	75 - 160	190		
Блок вводу проб		200		
Детектор		240		

Хроматографують 0.2 мкл розчину порівняння. При хроматографуванні за зазначених умов порядок виходу піків має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Залежно від умов проведення випробування та стану колонки, пік кумарину може виходити перед або після піка *транс*-2-метоксикоричного альдегіду. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення піка кумарину і *транс*-2-метоксикоричного альдегіду становить не менше 1.5.

Хроматографують 0.2 мкл випробовуваного розчину. Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст кожного компонента, у відсотках, методом внутрішньої нормалізації.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- *транс*-коричний альдегід: від 70 % до 90 %,
- *цинамілацетат*: від 1.0 % до 6.0 %,
- *евгенол*: менше 0.5 %,
- *кумарин*: від 1.5 % до 4.0 %,
- *транс*-2-метоксикоричний альдегід: від 3.0 % до 15 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла та нагрівання місці.

ПРОЕКТ

КОРИЦІ ЦЕЙЛОНСЬКОЇ КОРИ
ОЛІЯCinnamomi zeylanicii corticis
aetheroleum

CINNAMON BARK OIL, CEYLON

Кориці цейлонської кори олія одержана із кори гілок *Cinnamomum zeylanicum* Nees (C. *Verum* J.S. Presl.) методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, рухома рідина світло-жовтого кольору, що протягом часу стає червонуватою, із характерним запахом коричного альдегіду.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.

Друга ідентифікація: А.

А. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю Р.

Випробовуваний розчин. 1 мл субстанції розчиняють в ацетоні Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 50 мкл транс-коричного альдегіду Р, 10 мкл евгенолу Р і 10 мкл ліналолу Р і 10 мкл β-каріофілену Р розчиняють у 96 % спирті Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки смугами наносять 10 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників метанол Р - толуол Р (10:90). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі, обприскують розчином анісового альдегіду Р і переглядають при денному світлі при нагрівання при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв.

На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зони на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за кольором.

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль.

Часи утримування основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати із часами утримуванні основних піків на хроматограмі розчину порівняння. Піки, відповідні сафролу, кумарину і цинеолу, можуть бути відсутніми на хроматограмі випробовуваного розчину.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 1.000 до 1.030.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.572 до 1.591.

Оптичне обертання (2.2.7). Від -2° до +1°.

Хроматографічний профіль. Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння. 10 мкл цинеолу Р, 10 мкл ліналолу Р, 10 мкл β-каріофілену Р, 10 мкл сафролу Р, 100 мкл транс-коричного альдегіду Р, 10 мкл евгенолу Р, 20 мг кумарину Р і 10 мкл транс-2-метоксикоричного альдегіду Р і 10 мкл бензилбензоату Р розчиняють в 1 мл ацетону Р.

Хроматографування проводять на газовому хроматограмі із полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова розміром 60 м × 0.25 мм, покрита шаром макрогелю 20000 Р,
- газ-носіє гелій для хроматографії Р,
- лінійна швидкість газу-носія 1.5 мл/хв,
- поділ потоку 1:100,

Використовують таку програму температурного режиму:

	Час (хв)	Температура (°С)	Швидкість підвищення температури (°С/хв)	Примітки
Колонка	0 – 10	60	-	ізотермічний режим лінійний градієнт ізотермічний режим
	10 – 75	60 → 190	2	
	75 - 200	190		
Блок вводу проб		200		
Детектор		240		

Хроматографують 0.2 мкл розчину порівняння. При хроматографуванні за зазначених умов порядок виходу піків має відповідати по-

ряду зазначення речовин у складі розчину порівняння. Залежно від умов проведення випробування та стану колонки, пік кумарину може виходити перед або після піка *транс-2-метоксикоричного альдегіду*. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення піків ліналолу і β -каріофілену становить не менше 1.5.

Хроматографують 0.2 мкл випробовуваного розчину. Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст кожного компонента, у відсотках, методом внутрішньої нормалізації.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- *цинеол*: менше 3.0 %,
- *ліналол*: від 1.0 % до 6.0 %,
- *β -каріофілен*: від 1.0 % до 4.0 %,
- *сафрол*: менше 0.5 %,
- *транс-коричний альдегід*: від 55 % до 75 %,
- *евгенол*: менше 7.5 %,
- *кумарин*: менше 0.5 %,
- *транс-2-метоксикоричний альдегід*: від 0.1 % до 1.0 %,
- *бензилбензоат*: менше 1.0 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла та нагрівання місці.

ПРОЕКТ

КОРИЦІ ЦЕЙЛОНСЬКОЇ ЛИСТЯ ОЛІЯ

Cinnamomi zeylanici folii aetheroleum

CINNAMON LEAF OIL, CEYLON

Олія одержана із листя *Cinnamotum verum* J.S. Presl. методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, рухома рідина від червонува-то-коричневого до темно-коричневого кольору із характерним запахом евгенолу.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.

Друга ідентифікація: А.

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 1 мл субстанції розчиняють в *ацетоні Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 50 мкл *транс-коричного альдегіду Р*, 10 мкл *евгенолу Р* і 10 мкл *ліналолу Р* і 10 мкл *β -каріофілену Р* розчиняють у 96 % *спирті Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром *силікагелю Р*.

Рухома фаза: *метанол Р* - *толуол Р* (10:90).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.

Вігстань, яку має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують *розчином анісового альдегіду Р* і переглядають при денному світлі при нагрівання при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зони на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за кольором. Зона, відповідна *транс-коричному альдегіду* має бути дуже слабо забарвленою або відсутньою.

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль.

Результати: часи утримування основних піків на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати із часами утримуванні основних піків на хроматограмі розчину порівняння. Піки, відповідні *цинеолу*, *сафролу*, *транс-коричному альдегіду*, *цинамілацетату* та *кумарину* можуть бути відсутніми на хроматограмі випробовуваного розчину.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 1.030 до 1.059.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.527 до 1.540.

Оптичне обертання (2.2.7). Від -2.5° до $+2.0^\circ$.

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння. 10 мкл цинеолу Р, 10 мкл ліналолу Р, 10 мкл β-каріофілену Р, 10 мкл сафролу Р, 100 мкл транс-коричного альдегіду Р, 10 мкл цинамілацетату Р, 100 мкл евгенолу Р, 10 мг кумарину Р розчиняють в 1 мл ацетону Р.

Колонка:

- матеріал: кварц,
- розмір: 60 м × 0.25 мм,
- нерухома фаза: макрогол 20000 Р.

Газ-носії: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.5 мл/хв.

Піділ потоку: 1:100.

Температура:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 – 10	45
	10 – 78	45 → 180
	78 – 88	180
Блок вводу проб		200
Детектор		240

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0.2 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 1.5 між піками ліналолу та β-каріофілену.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- цинеол: менше 1.0 %,
- ліналол: від 1.5 % до 3.5 %,
- β-каріофілен: від 1.5 % до 7.0 %,
- сафрол: менше 3.0 %,
- транс-коричний альдегід: менше 3.0 %,
- цинамілацетат: менше 2.0 %,

- евгенол: від 70 % до 85 %,
- кумарин: менше 1.0 %,

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла та нагрівання місці.

ПРОЕКТ

ЛАВАНДОВА ОЛІЯ

Lavandulae aetheroleum

LAVANDER OIL

Ефірна олія, одержана із квітучих верхівок *Lavandula angustifolia* Miller (*Lavandula officinalis* Chaix) методом перегонки з водяною парою.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна або блідо-жовтого кольору рідина.

(Субстанція має характерний запах.)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.

Друга ідентифікація: А.

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 20 мкг субстанції розчиняють в 1 мл толуолу Р.

Розчин порівняння. 10 мкл ліналолу Р і 10 мкл ліналіл ацетату Р розчиняють в 1 мл толуолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: етилацетат Р - толуол Р (5:95).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.

Відстань, яку має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту, двічі з інтервалом у 5 хв.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують розчином анісового альдегіду Р, нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5-10 хв і відразу переглядають у денному світлі.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися й інші зони фіолетово-червоного або зеленувато-коричневого кольору вище зони ліналіл ацетату безпосередньо близько фронту розчинників.

Верхня частина пластинки	
	Декілька фіолетово-червоних або зеленувато-коричневих зон
Ліналіл ацетат: зона від фіолетового до коричневого кольору	Зона від фіолетового до коричневого кольору (ліналіл ацетат)
	Фіолетово-червона зона
	Можлива наявність слабо забарвленої фіолетово-коричневої зони (цинеол)
Ліналол: зона від фіолетового до коричневого кольору	Зона від фіолетового до коричневого кольору (ліналол)
	Слабко забарвлена фіолетово-коричнева зона
	Декілька зон невизначуваних речовин
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на хроматографічний профіль.

Нормування: характерні піки на хроматограмі випробовуваного розчину повинні мати той самий час утримування, що і на хроматограмі розчину порівняння (а).

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Відносна густина (2.2.5). Від 0.878 до 0.892.

Показник заломлення (2.2.6). Від 1.455 до 1.466.

Оптичне обертання (2.2.7). Від -12.5° до -7.0° .

Кислотне число (2.5.1). Не більше 1.0. 5.0 г субстанції розчиняють у 50 мл зазначеної суміші розчинників.

Хроматографічний профіль. Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. Випробовувана субстанція.

Розчин порівняння (а). 1.0 г лімонену Р, 0.2 г цинеолу Р, 0.2 г 3-октанону Р, 0.05 г камфори Р, 0.4 г ліналолу Р, 0.6 г ліналілу ацетату Р, 0.2 г терпінен-4-олу Р, 0.1 г лавандололу ацетату Р, 0.2 г лавандололу Р і 0.2 г α -терпінеолу Р розчиняють у 5 мл гексану Р.

Розчин порівняння (б). 5 мг 3-октанону Р розчиняють у гексані Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Колонка:

- *матеріал:* кварц,
- *розмір:* 60 м × 0.25 мм,
- *нерухома фаза:* макрогол 20000 Р (товщина шару 0.25 мкм).

Газ-носії: гелій для хроматографії Р.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.5 мл/хв.

Погіл потоку: 1:100.

Температура:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 - 15 15 - 70	70 70 → 180
Блок вводу проб		220
Детектор		220

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 0.2 мкл.

Порядок виходу піків: має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння (а). Відмічають часи утримування цих субстанцій.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (а):

- *коефіцієнт розділення:* не менше 1.4 між піками терпінен-4-олу та лавандололу ацетату.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння (а), визначають положення компонентів розчину порівняння (а) на хроматограмі випробовуваного розчину.

Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:

- лімонен: менше 1.0 %,
- цинеол: менше 2.5 %,
- 3-октанон: від 0.1 % до 2.5 %,
- камфора: менше 1.2 %,
- ліналол: від 20.0 % до 45.0 %,
- ліналілу ацетат: від 25.0 % до 46.0 %,
- терпінен-4-ол: від 0.1 % до 6.0 %,
- лавангололу ацетат: більше 0.2 %,
- лаванголол: більше 0.1 %,
- α -терпінеол: менше 2.0 %,
- не враховують: компоненти із площею піка, що відповідає площі піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %).

Домішки оптичних ізомерів. Газова хроматографія (2.2.28).

Випробовуваний розчин. 0.02 г субстанції розчиняють у пентані P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 10 мкл ліналолу P розчиняють у пентані P, додають 10 мкл ліналілу ацетату P, 5 мг борнеолу P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Колонка:

- матеріал: кварц,
- розмір: 25 м × 0.25 мм,
- нерухома фаза: β -циклодекстрин модифікований для хіральної хроматографії P (товщина шару 0.25 мкм).

Газ-носії: гелій для хроматографії P.

Лінійна швидкість газу-носія: 1.3 мл/хв.

Погіл потоку: 1:30.

Температура:

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 – 65	50 → 180
Блок вводу проб		230
Детектор		230

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм проби, що вводиться: 1 мкл.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 5.5 між піками (R)-ліналолу (1^{ий} пік) і (S)-ліналолу (2^{ий} пік), не менше 2.9 між піками (S)-ліналолу та борнеолу (3^{ий} пік), не менше 2.7 між піками (R)-ліналілу ацетату (4^{ий} пік) і (S)-ліналілу ацетату (5^{ий} пік).

Вміст (S)-енантіомерів, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_S}{A_S + A_R} \times 100,$$

де:

A_S — площа піка (S)-енантіомера,

A_R — площа піка (R)-енантіомера.

Нормування:

- (S)-ліналол: не більше 12 %,
- (S)-ліналілу ацетат: не більше 1 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °C.

ПРОЕКТ

МАСЛИНОВА ОЛІЯ НЕРАФІНОВАНА

Olivae oleum virginalе

OLIVE OIL, VIRGIN

Маслинова (оливкова) нерафінована олія — жирна олія, одержана зі стиглих плодів *Olea europaea* L. методом холодного пресування або іншим підходящим механічним способом.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора рідина жовтого або зеленувато-жовтого кольору із характерним запахом.

Розчинність. Практично не розчинна в 96 % спирті P, змішується з петролейним ефіром P (температура кипіння: від 50 °C до 70 °C).

(При охолодженні починає каламутніти при температурі 10 °C і перетворюється на олієподібну масу при температурі близько 0°.)

(Відносна густина: близько 0.913.)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). На одержаній хроматограмі мають виявлятися плями, відповідні плямам на типовій хроматограмі маслинової олії. Для певних типів рафінованої маслинової олії різниця в розмірі плям E та F може бути меншою, ніж на типовій хроматограмі.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Кислотне число (2.5.1). Не більше 2.0. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Перекисне число (2.5.5, метод А). Не більше 20.0.

Неомилювані речовини (2.5.7). Не більше 1.5 %.

5.0 г субстанції (*m*, г) поміщають у колбу місткістю 150 мл, споряджену зворотним холодильником, додають 50 мл 2 М розчину калію гідроксиду спиртового Р і нагрівають на водяній бані протягом 1 год при постійному струшуванні. До одержаної суміші через холодильник додають 50 мл води Р, струшують, охолоджують і вміст колби переносять у ділильну лійку. Колбу обполіскують кількома порціями петролейного ефіру Р1 (всього 50 мл), промивну рідину додають до суміші у ділильній лійці, ретельно струшують протягом 1 хв і після розділення шарів переносять водний шар в іншу ділильну лійку. У разі утворення емульсії додають невеликими порціями 96 % спирт Р або концентрований розчин калію гідроксиду Р. Водний шар струшують із 2 порціями, по 50 мл кожна, петролейного ефіру Р1. Об'єднані шари петролейного ефіру поміщають у третю ділильну лійку, промивають трьома порціями, по 50 мл кожна, спирту (50 % об/об) Р і шар петролейного ефіру переносять у попередньо зважену колбу місткістю 250 мл. Ділильну лійку обполіскують невеликими порціями петролейного ефіру Р1 і промивну рідину додають у колбу. Петролейний ефір випарюють на водяній бані та залишок сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв, тримаючи колбу горизонтально. Одержаний залишок охолоджують в ексикаторі та зважують (*a*, г). Висушування повторюють періодами тривалістю по 15 хв, доки різниця втрати в масі при висушуванні двох послідовних зважувань буде менше 0.1 %. Одержаний залишок розчиняють у 20 мл 96 % спирту Р, попередньо нейтралізованого 0.1 мл розчину бромтимолового синього Р. Якщо необхідно, титрують 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої (*b*, мл).

Вміст неомилюваних речовин обчислюють за формулою:

$$\frac{100(a - 0.032b)}{m}$$

Якщо 0.032*b* становить більше 5 % від *a*, субстанція не витримала випробування; випробування має бути повторене.

Оптична густина (2.2.25). 1.00 г субстанції розчиняють у циклогексані Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. Оптична густина одержаного розчину за довжини хвилі 270 нм має бути не більше 0.20. Відношення оптичної густини за довжини хвилі 232 нм до оптичної густини за довжини хвилі 270 нм має бути більше 8.

Жирнокислотний склад (2.4.22, метод А). Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше C₁₆: не більше 0.1 %,
- пальмітинова кислота: від 7.5 % до 20.0 %,
- пальмітолеїнова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 16.3): не більше 3.5 %,
- стеаринова кислота: від 0.5 % до 5.0 %,
- олеїнова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.3): від 56.0 % до 85.0 %,
- ліолева кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.9): від 3.5 % до 20.0 %,
- ліноленова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 19.7): не більше 1.2 %,
- арахідонова кислота: не більше 0.7 %,
- ейкозанова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 20.3): не більше 0.4 %,
- бегенова кислота: не більше 0.2 %,
- лігноцерінова кислота: не більше 0.2 %.

Стерини (2.4.23). Склад фракції стеринів має бути таким:

- сума вмісту β-ситостерину, Δ⁵,23-стигмастагієнолу, клеростерину, ситостанолу, Δ⁵-авенастерину та Δ⁵,24-стигмастагієнолу: не менше 93.0 %,
- холестерин: не більше 0.5 %,
- Δ⁷-стигмастерин: не більше 0.5 %,
- кампестерин: не більше 4.0 %.

Вміст стигмастерину не має перевищувати вміст кампестерину.

Кунжутова олія. 10 мл субстанції поміщають у циліндр із притертою скляною пробкою, струшують із сумішшю 0.5 мл розчину 0.35 % (об/об) фурфуролу Р в оцтовому ангідриді Р і 4.5 мл оцтового ангідриду Р протягом близько 1 хв і фільтрують крізь паперовий фільтр, про-

сочений оцтовим ангіридом *P*. До одержаного фільтрату додають 0.2 мл кислоти сірчаної *P*; не має з'являтися синювато-зелене забарвлення.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С.

ПРОЕКТ

МАСЛИНОВА ОЛІЯ РАФІНОВАНА

Olivae oleum raffinatum

OLIVE OIL, REFINED

Маслинова (оливкова) рафінована олія - жирна олія, одержана рафінуванням неочищеної маслинової олії, одержаної зі стиглих плодів *Olea europaea* L. методом холодного пресування або іншим підходящим механічним способом. Може бути доданий підходящий антиоксидант.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна або зеленувато-жовтого кольору рідина.

Розчинність. Практично не розчинна в 96 % спирті *P*, змішується з петролейним ефіром *P* (температура кипіння: від 50 °С до 70 °С).

(При охолодженні починає каламутніти при температурі 10 °С і перетворюється на олієподібну масу при температурі близько 0°.)

(Відносна густина: близько 0.913.)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Субстанція має витримувати випробування «Кислотне число», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

В. Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). На одержаній хроматограмі мають виявлятися плями, відповідні плямам на типовій хроматограмі маслинової олії. Для певних типів рафінованої маслинової олії різниця в розмірі плям Е та F може бути меншою, ніж на типовій хроматограмі.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Кислотне число (2.5.1). Не більше 0.3. Визначення проводять із 10.0 г субстанції.

Перекисне число (2.5.5, метод А). Не більше 10.0. Не більше 5.0, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

Неомильовані речовини (2.5.7). Не більше 1.5 %.

5.0 г субстанції (*m*, г) поміщають у колбу місткістю 150 мл, споряджену зворотним холодильником, додають 50 мл 2 М розчину калію гідроксиду спиртового *P* і нагрівають на водяній бані протягом 1 год при постійному струшуванні. До одержаної суміші через холодильник додають 50 мл води *P*, струшують, охолоджують і вміст колби переносять у ділительну лійку. Колбу обполіскують кількома порціями петролейного ефіру *P1* (всього 50 мл), промивну рідину додають до суміші у ділительній лійці, ретельно струшують протягом 1 хв і після розділення шарів переносять водний шар в іншу ділительну лійку. У разі утворення емульсії додають невеликими порціями 96 % спирт *P* або концентрований розчин калію гідроксиду *P*. Водний шар струшують із 2 порціями, по 50 мл кожна, петролейного ефіру *P1*. Об'єднані шари петролейного ефіру поміщають у третю ділительну лійку, промивають трьома порціями, по 50 мл кожна, спирту (50 % об/об) *P* і шар петролейного ефіру переносять у попередньо зважену колбу місткістю 250 мл. Ділительну лійку обполіскують невеликими порціями петролейного ефіру *P1* і промивну рідину додають у колбу. Петролейний ефір випарюють на водяній бані та залишок сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв, тримаючи колбу горизонтально. Одержаний залишок охолоджують в ексикаторі та зважують (*a*, г). Висушування повторюють періодами тривалістю по 15 хв, доки різниця втрати в масі при висушуванні двох послідовних зважувань буде менше 0.1 %. Одержаний залишок розчиняють у 20 мл 96 % спирту *P*, попередньо нейтралізованого 0.1 мл розчину бромтимолового синього *P*. Якщо необхідно, титрують 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої (*b*, мл).

Вміст неомильованих речовин обчислюють за формулою:

$$\frac{100(a - 0.032b)}{m}$$

Якщо 0.032b становить більше 5 % від a, субстанція не витримала випробування; випробування має бути повторене.

Лужні домішки (2.4.19). Субстанція має витримувати випробування на лужні домішки у жирних оліях.

Питомий показник поглинання (2.2.25). 1.00 г субстанції розчиняють у циклогексані P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. Питомий показник поглинання одержаного розчину за довжини хвилі 270 нм має бути не більше 1.20.

Жирнокислотний склад (2.4.22, метод A). Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше C_{16} : не більше 0.1 %,
- пальмітинова кислота: від 7.5 % до 20.0 %,
- пальмітолеїнова кислота (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 16.3): не більше 3.5 %,
- стеаринова кислота: від 0.5 % до 5.0 %,
- олеїнова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.3): від 56.0 % до 85.0 %,
- лінолева кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.9): від 3.5 % до 20.0 %,
- ліноленова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 19.7): не більше 1.2 %,
- арахідонова кислота: не більше 0.7 %,
- ейкозанова кислота: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 20.3): не більше 0.4 %,
- бегенова кислота: не більше 0.2 %,
- лігноцерінова кислота: не більше 0.2 %.

Стерини (2.4.23). Склад фракції стеринів має бути таким:

- сума вмісту β -ситостерину, $\Delta 5,23$ -стигмастагієнолу, клеростерину, ситостанолу, $\Delta 5$ -авенастерину та $\Delta 5,24$ -стигмастагієнолу: не менше 93.0 %,
- холестерин: не більше 0.5 %,
- $\Delta 7$ -стигмастерин: не більше 0.5 %,
- кампестерин: не більше 4.0 %.

Вміст стигмастерину не має перевищувати вміст кампестерину.

Кунжутова олія. 10 мл субстанції поміщають у циліндр із притертою скляною пробкою, струшують із сумішшю 0.5 мл розчину 0.35 % (об/об) фурфуролу P в оцтовому ангідриді P і

4.5 мл оцтового ангідриду P протягом близько 1 хв і фільтрують крізь паперовий фільтр, просочений оцтовим ангідридом P. До одержаного фільтрату додають 0.2 мл кислоти сірчаної P; не має з'являтися синювато-зелене забарвлення.

Вода (2.5.32). Не більше 0.1 %, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування. Визначення проводять із 5.0 г субстанції колориметричним методом, використовуючи як розчинник суміш рівних об'ємів деканолу P та метанолу безводного P.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С. Якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування, її зберігають в атмосфері інертного газу.

МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- у необхідних випадках: субстанція придатна для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування,
- назву та концентрацію доданого антиоксиданта,
- назву інертного газу.

ПРОЕКТ

МИГДАЛЬНА ОЛІЯ НЕРАФІНОВАНА

Amygdalae oleum virginale

ALMOND OIL, VIRGIN

Жирна олія, одержана зі стиглого насіння *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb var. *dulcis* або *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb var. *amara* (D.C.) Buchheim або суміші двох різновидів методом холодного пресування.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора рідина жовтого кольору.

Розчинність. Мало розчинна в 96 % спирті P, змішується з петролейним ефіром P.

(Твердіє при температурі близько -18°C .)

(Відносна густина — близько 0.916.)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, С.

Друга ідентифікація: А, В.

А. Субстанція має витримувати випробування «Оптична густина», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

В. Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). Одержана хроматограма має бути порівняною з типовою хроматограмою мигдальної олії.

С. Субстанція має витримувати випробування «Жирнокислотний склад», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Оптична густина (2.2.25). 0.100 г субстанції розчиняють у *циклогексані Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл. Оптична густина одержаного розчину, виміряна в максимумі в області довжин хвиль від 264 нм до 276 нм, має не більше 0.2. Відношення оптичної густини за довжини хвилі 232 нм до оптичної густини за довжини хвилі 270 нм має бути не більше 7.

Кислотне число (2.5.1). Не більше 2.0. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Перекисне число (2.5.5). Не більше 15.0.

Неомилювані речовини (2.5.7). Не більше 0.7 %. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Жирнокислотний склад (2.4.22, *метод А*). Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- *насичені жирні кислоти із довжиною ланцюга менше C_{16}* : не більше 0.1 %,
- *пальмітинова кислота*: від 4.0 % до 9.0 %,
- *пальмітолеїнова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 16.3): не більше 0.6 %,
- *маргарінова кислота*: не більше 0.2 %,
- *стаєринова кислота*: не більше 3.0 %,
- *олеїнова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.3): від 62.0 % до 86.0 %,
- *лінолева кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 18.9): від 20.0 % до 30.0 %,

— *ліноленова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 19.7): не більше 0.4 %,

— *арахідонова кислота*: не більше 0.2 %,

— *ейкозанова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 20.3): не більше 0.3 %,

— *бегенова кислота*: не більше 0.2 %,

— *ерукова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленглікольадипінаті 22.3): не більше 0.1 %.

Стерини. Проводять ви пробування на стерини в жирних маслах (2.4.23). Склад фракції стеринів має бути таким:

— *холестерин*: не більше 0.7 %,

— *кампестерин*: не більше 4.0 %,

— *стигмастерин*: не більше 3.0 %,

— *β -ситостерин*: від 73.0 % до 87.0 %,

— *Δ^5 -авенастерин*: не менше 10.0 %,

— *Δ^7 -авенастерин*: не більше 3.0 %,

— *Δ^7 -стигмастенол*: не більше 3.0 %,

— *брасикастерин*: не більше 0.3 %.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці.

ПРОЕКТ

МИГДАЛЬНА ОЛІЯ РАФІНОВАНА

Amygdalae oleum raffinatum

ALMOND OIL, REFINED

Жирна олія, одержана зі стиглого насіння *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb var. *dulcis* або *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb var. *amara* (D.C.) Buchheim або суміші двох різновидів методом холодного пресування та потім рафінована. Може бути доданий підходящий антиоксидант.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора рідина блідо-жовтого кольору.

Розчинність. Мало розчинна в 96 % *спирті Р*, змішується з *петролейним ефіром Р*.

(Відносна густина: близько 0.916.)

(Твердіє при температурі близько -18°C .)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Проводять ідентифікацію жирних олій методом тонкошарової хроматографії (2.3.2). Одержана хроматограма має бути порівняною з типовою хроматограмою мигдальної олії.

В. Субстанція має витримувати випробування «Жирнокислотний склад», як зазначено в розділі «Випробування на чистоту».

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Питомий показник поглинання (2.2.25). 0.100 г субстанції розчиняють у циклогексані Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл. Питомий показник поглинання одержаного розчину, виміряний у максимумі в області довжин хвиль від 264 нм до 276 нм, має бути від 0.2 до 6.0.

Кислотне число (2.5.1). Не більше 0.5. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Перекисне число (2.5.5). Не більше 5.0.

Неомилювані речовини (2.5.7). Не більше 0.9 %. Визначення проводять із 5.0 г субстанції.

Жирнокислотний склад (2.4.22, метод А). Використовують суміш речовин, застосовуваних для калібрування, наведену у Таблиці 2.4.22.-3.

Склад фракції жирних кислот має бути таким:

- *насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше C₁₆*: не більше 0.1 %,
- *пальмітинова кислота*: від 4.0 % до 9.0 %,
- *пальмітолеїнова кислота* (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 16.3): не більше 0.8 %,
- *маргарінова кислота*: не більше 0.2 %,
- *стеаринова кислота*: не більше 3.0 %,
- *олеїнова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 18.3): від 62.0 % до 86.0 %,

- *лінолева кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 18.9): від 20.0 % до 30.0 %,
- *ліноленова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 19.7): не більше 0.4 %,
- *арахідонова кислота*: не більше 0.2 %,
- *ейкозанова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 20.3): не більше 0.3 %,
- *бегенова кислота*: не більше 0.2 %,
- *ерукова кислота*: (еквівалент довжини ланцюга на поліетиленгліколядипінаті 22.3): не більше 0.1 %.

Стерини (2.4.23). Склад фракції стеринів має бути таким:

- *холестерин*: не більше 0.7 %,
- *кампестерин*: не більше 5.0 %,
- *стигмастерин*: не більше 4.0 %,
- *β-ситостерин*: від 73.0 % до 87.0 %,
- *Δ5-авенастерин*: не менше 5.0 %,
- *Δ7-стигмастенол*: не більше 3.0 %,
- *Δ7-авенастерин*: не більше 3.0 %,
- *брасикастерин*: не більше 0.3 %.

Вода (2.5.32). Не більше 0.1 %, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування. Визначення проводять із 5.000 г субстанції.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці.

МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- у необхідних випадках: субстанція придатна для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування,
- назву та концентрацію доданого антиоксиданта.

УДК 615.11:615.322

Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Боярышника листья и цветки»

Проведен сравнительный анализ показателей качества цветков (и листьев) боярышника, регламентируемых ЕФ и ГФ XI. Показано, что данные статьи являются документами, регламентирующими качество разных типов сырья. Исследуемое отечественное лекарственное растительное сырье по таким разделам, как «Вводная часть», «Макроскопия», «Микроскопия» а также по фенольному составу (метод ТСХ) соответствует требованиям ЕФ. Предложено включить в национальные требования монографии ГФУ виды производящего растения, приведенные в ГФ XI. Показана необходимость дополнительных исследований по показателю «Количественное определение».

Боярышник (*Crataegus L.*), пожалуй, один из самых популярных родов, плоды, цветки и листья многих видов которого широко используются как в народной, так и в научной медицине. Плоды и цветки боярышника являются официальными практически во всех европейских странах и станах СНГ [1, 2, 3].

Стандартизация цветков и листьев боярышника в ведущих Фармакопеях: Европейской [4], Французской [5], Чешской [6], DAB [7] проводится по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на гиперозид, с регламентацией — не менее 1.5 %.

В Швейцарской Фармакопее 8 издания [8] стандартизация цветков и листьев боярышника проводится по количественному содержанию флавонон-С-гликозидов, в пересчете на витексин, с регламентацией не менее 0.6 %.

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) также приводит данные о содержании в цветках и листьях боярышника не менее 1.5 % флавоноидов, в пересчете на гиперозид, и не менее 0.6 % флавонон-С-гликозидов, в пересчете на витексин, со ссылками на вышеуказанные Фармакопеи [9].

Показательным для введения европейских требований на лекарственное растительное сырье в национальную фармакопею является подход Чешской Фармакопеи. В ЧФ 97 [10] была приведена национальная статья на цветки и листья боярышника, где приводится спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов, в пересчете на гиперозид, основанная на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, при этом регламентируется не менее 0.7 % суммы флавоноидов (в ЕФ 97 подобная монография отсутствует). С введением в ЕФ 4-го издания [11] монографии на листья и цветки боярышника данная монография была введена в ЧФ [6] взамен национальной.

Целью настоящей работы является исследование возможности гармонизации национальной законодательной базы (ГФУ) по контролю качества лекарственного растительного сырья, в частности монографии на листья и цветки боярышника, с ЕФ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: проведение сравнительного анализа показателей качества листьев и цветков боярышника, регламентируемых монографией ЕФ «Hawthorn leaf and flower» и статьей ГФ XI «Цветки боярышника», исследование отечественного сырья на соответствие требованиям данных документов.

При сравнении требований к качеству цветков и листьев боярышника, описанных в ЕФ и ГФ XI [9], выяснено следующее.

Название. Монография ЕФ называется «Боярышника листья и цветки», монография ГФ XI - «Цветки боярышника». Казалось бы, одна только разница в названии монографий ЕФ и ГФ XI ставит под вопрос дальнейшее обсуждение. Однако мы решили выполнить все поставленные задачи, потому что обсуждаемые ниже разделы монографии имеют непосредственное отношение к заготовщикам и поставщикам данного вида растительного лекарственного сырья и к проблемам, обсуждаемым нами в работе [13], поднимающей вопросы введения в ГФУ монографии на плоды боярышника.

Вводная часть. В ЕФ описаны 5 видов боярышника и их гибриды, из которых три вида также описаны в ГФ XI среди 13 видов, разрешенных к применению (Табл. 1). В ходе работы, как уже отмечено в [13], было выяснено, что при довольно большом видовом разнообразии рода боярышник на территории Украины, приняв в ГФУ без изменений монографию ЕФ, производители и потребители лишаться 10 видов этого популярного растительного лекарственного сырья. Одни из них фор-

Таблица 1

Сравнительные данные по описанию цветков (и листьев) боярышника по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Hawthorn leaf and flower»	ГФ XI «Цветки боярышника»
Описание	Целые или измельченные высушенные веточки с цветками <i>Crataegus monogyna</i> Jacq. (Lindm.), <i>C. laevigata</i> (Poiret) D.C. (<i>C. oxyacanthoides</i> Thuill.) или их гибриды, или, очень редко, другие европейские виды <i>Crataegus</i> , включая <i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit. ex Willd., <i>C. nigra</i> Waldst. et Kit., <i>C. azarolus</i> L.	Собранные в начале цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев: боярышника кроваво-красного — <i>Crataegus sanguinea</i> Pall.; боярышника сглаженного — <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышника колючего—<i>C. oxyacantha sensu</i> Pojark.); боярышника Королькова — <i>C. korolkowii</i> L. Henry боярышника [алтайского — <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange]; боярышника желтого — <i>C. chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch; боярышника даурского — <i>C. dahurica</i> Koehne ex Schneid.; боярышника однопестичного — <i>C. monogyna</i> Jacq.; боярышника германского — <i>C. alemanniensis</i> Cin.; боярышника восточно-балтийского — <i>C. orientobaltica</i> Cin.; боярышника отогнуточашелистикowego — <i>C. curvisepala</i> Lindm.; боярышника курземского— <i>C. X curonica</i> Cin.; боярышника даугавского — <i>C. X dunensis</i> Cin.; боярышника пятипестичного — <i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit., сем. розоцветных — Rosaceae.

Примечание.

Жирным шрифтом отмечены виды боярышника, произрастающие на территории Украины.

мально подпадают под действие раздела монографии ЕФ «Посторонние примеси» (плод содержит более трех косточек), и не могут быть использованы в качестве лекарственного сырья, а другие виды, не описанные в ЕФ (не произрастающие на территории Украины), не могут экспортироваться с ближнего зарубежья (Россия, Белоруссия, Казахстан).

Таким образом, возникают те же проблемы, что и с плодами боярышника, связанные с существенным сужением круга используемого для производства лекарственных препаратов сырья.

Макроскопия (Внешние признаки). ЕФ дает информацию о 5 видах боярышника, детально описывая внешний вид листьев и цветков. В ГФ XI дана общая характеристика только соцветий и цветков.

Микроскопия. Различие наблюдается прежде всего в проведении эксперимента. По ГФ XI исследуют препараты цветков, в ней описаны фрагменты только чашелистиков и лепестков. По ЕФ испытания проводят на измельченном

сырье, при этом описаны диагностические признаки цветков, листьев, стеблей.

Идентификация. Метод тонкослойной хроматографии (Качественные реакции). В ЕФ идентификация проводится методом тонкослойной хроматографии (2.2.27). Приведен полный хроматографический профиль испытуемого раствора, полученный в условиях определения и состоящий из флавоноидов (витексин-4-рамнозид, гиперозид, витексин), фенолкарбоновых кислот (хлорогеновая), а также близлежащих родственных соединений. В ГФ XI идентификация проводится также методом ТСХ, однако регламентируется наличие одного пятна на уровне ГСО гиперозида (Табл. 2).

Посторонние примеси. Монографией ЕФ регламентируется содержание веточек диаметром не более 2.5 мм и других примесей (минеральной и органической). ГФ XI регламентирует содержание веточек и листьев (Табл. 3).

Как в ЕФ, так и в ГФ XI приведены показатели «Общая зола», «Потеря в массе при высушивании», однако нормирование разное.

Таблица 2

Сравнительные данные по идентификации (метод ТСХ) цветков (и листьев) боярышника по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Hawthorn leaf and flower»	ГФ XI «Цветки боярышника»
ТСХ	Ниже приведена последовательность зон на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения. На хроматограмме испытуемого раствора могут также обнаруживаться другие флуоресцирующие зоны.	На уровне пятна ГСО гиперозида должна появиться полоса темно-коричневого цвета. Затем пластинку обрабатывают 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в течение 2-3 мин в сушильном шкафу при температуре 100-105°C. При этом пятно приобретает ярко-желтую окраску в видимом и яркую желто-зеленую флуоресценцию в УФ-свете (гиперозид).

ГФ XI дополнительно регламентирует количество золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной.

Количественное определение. По этому разделу в методиках и регламентации наблюдается существенная разница.

Таким образом, сравнительный анализ монографии ЕФ и статьи ГФ XI показал, что, приняв в ГФУ без изменений монографию ЕФ, возникают проблемы, связанные с тем, что некоторые виды боярышника, произрастающие на территории Украины, не могут быть использованы в качестве лекарственного растительного сырья.

В качестве объектов исследования были использованы имеющиеся на сегодняшний день образцы цветков боярышника, собранные в 2003-2004 гг. поставщиками лекарственного растительного сырья в Сумской (1), Кировоградской (2), Харьковской (3) областях. Анали-

зируемые образцы представляли собой смеси однопестичного, сглаженного и пятипестичного боярышника.

Товароведческий, макроскопический, микроскопический анализ проводили в соответствии с требованиями ГФ XI [14], фитохимический анализ — по методикам, описанными в ЕФ, ГФ XI, Дополнении 1 к ГФУ 1-го издания [15].

Результаты анализа образцов боярышника на соответствие требованиям ГФ XI представлены в Табл. 4.

Все проанализированные образцы **не удовлетворяли** требованиям данной статьи по показателям «Описание», «Внешние признаки», «Микроскопия», так как исследуемые образцы сырья представляют собой листья и цветки боярышника (что соответствует требованиям ЕФ). Образцы забракованы из-за наличия большого количества листьев и тонких вето-

Таблица 3

Сравнительные данные по числовым показателям и количественному определению цветков (и листьев) боярышника по монографии ЕФ и статье ГФ XI

Показатели	ЕФ «Hawthorn Hawthorn leaf and flower»	ГФ XI «Цветки боярышника»
другие части боярышника (веточки, листья)		не более 6 %
веточки диаметром более 2.5 мм	не более 8 %	
органическая примесь	не более 2 %	не более 0.5 %
минеральная примесь		не более 0.5 %
потеря в массе при высушивании (влажность)	не более 10.0 %	не более 14 %
общая зола	не более 10.0 %	не более 12 %
зола, нерастворимая в 10 % растворе кислоты хлористоводородной		не более 3.5 %
количественное определение	не менее 1.5 % флавоноидов, в пересчете на гиперозид	не менее 0.5 % гиперозида

Таблица 4

Результаты анализа образцов цветков боярышника в соответствии с требованиями ГФ XI

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		-	-	-
внешние признаки		-	-	-
микроскопия		-	-	-
качественные реакции	ТСХ	+	+	+
другие части боярышника (веточки, листья)	не более 6 %	91.0 %	86.0 %	88.0 %
органическая примесь	не более 0.5 %	не обн.	не обн.	не обн.
минеральная примесь	не более 0.5 %	0.1 %	не обн.	0.05 %
влажность	не более 14 %	9.6 %	7.8 %	8.3 %
общая зола	не более 12 %	7.4 %	8.0 %	6.3 %
зола, нерастворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты	не более 3.5 %	1.5 %	2.0 %	2.1 %
количественное определение	не менее 0.5 % гиперозида	0.73 %	0.70 %	0.76 %

Примечания:

— — не соответствует требованиям;

+ — соответствует требованиям.

чек - до 91 % (по требованиям ГФ XI других частей боярышника должно быть не более 6 %).

Результаты анализа образцов боярышника на соответствие требованиям ЕФ представлены в Табл. 5.

При проведении микроскопических исследований на соответствие требованиям ЕФ во всех образцах были обнаружены характерные диагностические признаки. Исследования проводили в соответствии с требованиями статьи ГФ XI «Методы анализа лекарственного растительного сырья» [14], в которой описана техника микроскопического анализа, так как аналогичная статья в ЕФ отсутствует.

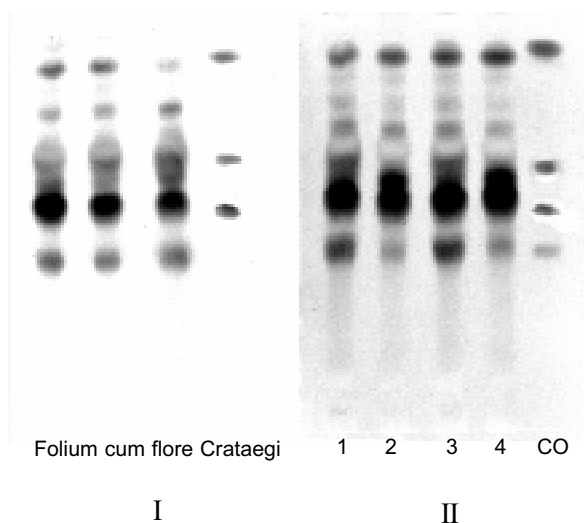
При проведении исследований, связанных с идентификацией сырья по методике ТСХ, описанной в ЕФ, были использованы хроматографические пластинки «Silica gel 60 F₂₅₄» фирмы «Merck». Отмечалось хорошее разделение веществ, входящих в состав раствора сравнения (гиперозид, кислота хлорогеновая), а также разделение компонентов испытуемого раствора (Рис. 1). Все исследуемые образцы удовлетворяли требованиям ЕФ по хроматографическому профилю фенольных соединений.

В этих же хроматографических условиях дополнительно было проведено хроматографирование листьев боярышника и цветков боярышника, которые получили из исходного сырья, вручную отделяя их друг от друга (Рис. 1). Как видно из рисунка, хроматографические профили растворов листьев и цветков близки друг другу (небольшое различие наблюдается в интенсивности зон, находящаяся на уровне зоны рутина), в то же время они практически совпадают с хроматографичес-

ким профилем раствора, полученного из исследуемого сырья, представляющего собой смесь листьев и цветков боярышника. Таким образом, проведенные исследования показали, что все исследуемое сырье, независимо от того цветки это или листья боярышника, соответствует требованиям ЕФ по хроматографическому профилю фенольных соединений.

По показателю «Посторонние примеси» все проанализированные образцы соответствуют требованиям ЕФ.

Рисунок 1



Типичные хроматограммы, полученные при идентификации сырья по методике ЕФ

I - хроматограммы растворов исследуемых образцов сырья и раствора СО кислоты хлорогеновой, гиперозида и кислоты кофейной;

II - хроматограммы отдельно листьев (1; 3) и отдельно цветков боярышника (2; 4) и раствора СО рутина, кислоты хлорогеновой, гиперозида и кислоты кофейной.

Таблица 5

Результаты анализа образцов цветков и листьев боярышника в соответствии с требованиями ЕФ

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		+	+	+
макроскопия		+	+	+
микроскопия		+	+	+
ТСХ		+	+	+
веточки диаметром более 2.5 мм	не более 8 %	7.4 %	5.1 %	4.2 %
органическая примесь	не более 2 %	не обн.	не обн.	не обн.
минеральная примесь		0.1 %	не обн.	0.05 %
потеря в массе при высушивании	не более 10.0 %	9.6 %	7.8 %	8.3 %
общая зола	не более 10.0 %	7.4 %	8.0 %	6.3 %
количественное определение	не менее 1.5 % флавоноидов, в пересчете на гиперозид	1.59 %	1.39 %	1.54 %

Примечание.

+ — соответствует требованиям.

В монографии ЕФ на листья и цветки боярышника проводится количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете на гиперозид (не менее 1.5 %).

Методика заключается в следующем: сырье экстрагируют спиртом, аликвоту полученного раствора упаривают и проводят реакцию с реактивом, состоящим из кислоты борной, кислоты щавелевой в кислоте муравьиной. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 410 нм. Содержание флавоноидов рассчитывают, используя удельный показатель поглощения гиперозида, равный 405.

УФ-спектр поглощения испытуемого раствора цветков и листьев боярышника, полученный при определении количественного содержания суммы флавоноидов, представлен на Рис. 2.

Как видно из Табл. 5, при анализе образцов сырья по данной методике было установлено, что в образце листьев и цветков боярышника (2) содержание флавоноидов ниже регламентируемого значения, т.е. данный образец не удовлетворяет требованиям ЕФ.

По ГФ XI методика определения гиперозида в цветках боярышника заключается в следующем: проводят экстракцию сырья 95 % спиртом и аликвоту полученного раствора параллельно с раствором СО гиперозида наносят на хроматографическую пластинку. После проведения двойного хроматографирования вырезают участки пластинки, соответствующие зонам гиперозида, проводят экстрагирование определяемых веществ со слоя адсорбента и далее измеряют оптическую плот-

ность полученных растворов при длине волны 365 нм.

Спектры поглощения испытуемого раствора цветков боярышника и раствора СО гиперозида, полученные при определении количественного содержания гиперозида по методике ГФ XI, приведен на Рис. 3.

Как видно из Табл. 4, при анализе образцов сырья по данной методике было установлено, что в образце листьев и цветков боярышника (2) содержание гиперозида ниже регламентируемого значения, т.е. данный образец не удовлетворяет требованиям ГФ XI, как и требованиям ЕФ.

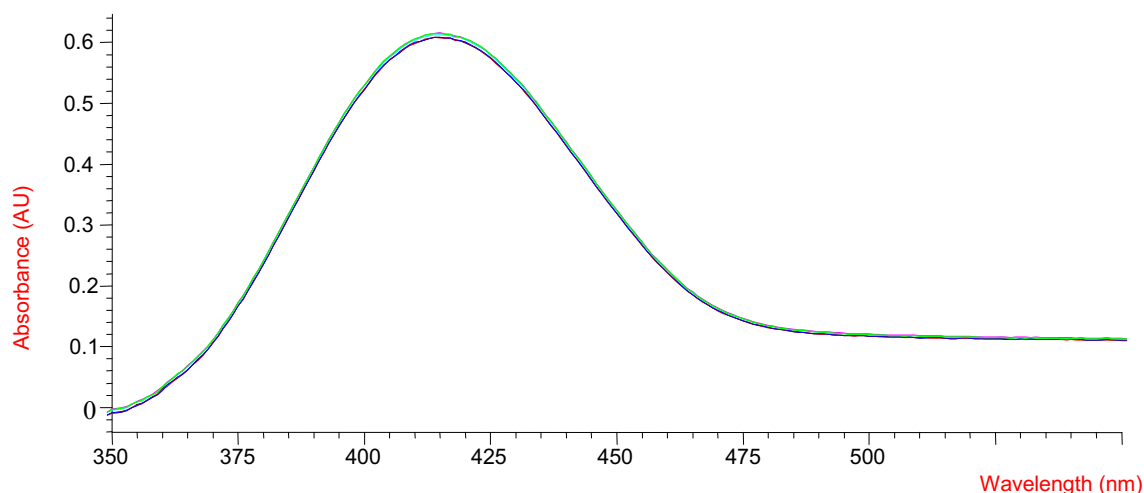
Таким образом, сравнивая две апробированные методики, предпочтительнее, на наш взгляд, является методика ЕФ, как менее трудоемкая и не предусматривающая использование дорогостоящего стандартного образца. Окончательный же вывод о соответствии данного вида сырья требованиям ЕФ по количественному содержанию суммы флавоноидов можно сделать только после анализа сырья на большем количестве образцов.

Выводы

1. Проведенный сравнительный анализ показателей качества монографий ЕФ и статьи ГФ XI показал, что данные статьи являются документами, регламентирующими качество различных типов сырья (в ЕФ описаны листья и цветки боярышника, в ГФ XI — цветки).

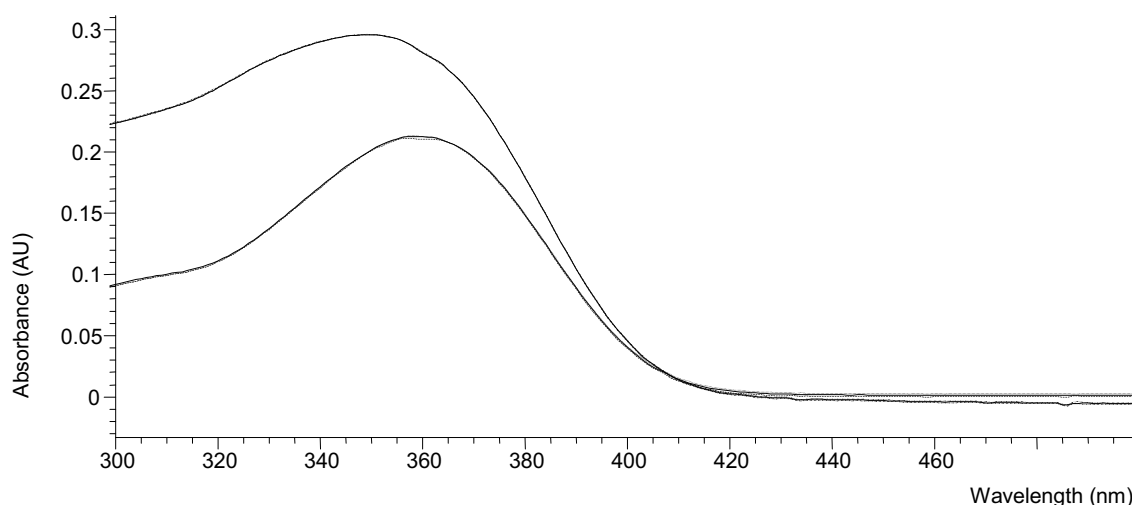
2. Проведенные исследования показали, что по таким разделам, как «Вводная часть», «Макроскопия», «Микроскопия» отечественное лекарственное растительное сырье, име-

Рисунок 2



УФ-спектр поглощения испытуемого раствора цветков и листьев боярышника, полученный при определении суммы флавоноидов по методике ЕФ

Рисунок 3



УФ-спектры испытуемого раствора цветков и листьев боярышника (II) и раствора СО гиперозида (I), полученные при определении содержания гиперозида по методике ГФ XI

ющееся в нашем распоряжении, полностью соответствует требованиям ЕФ. Фенольный состав проанализированных образцов по методике ТСХ соответствует требованиям ЕФ, а оценка содержания флавоноидов требует дополнительных исследований различных образцов.

3. При введении в ГФУ монографии ЕФ на листья и цветки боярышника в национальную часть необходимо включить виды производящих растений, приведенные в ГФ XI.

Для окончательного решения вопроса о соответствии данного вида сырья требованиям ЕФ необходимо участие заинтересованных лиц в предоставлении образцов для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзінський. - Київ: Голов. ред. УРЕ, 1990. - 544 с.
2. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / За ред. В.М. Ковальова. - Харків: Прапор, 2000. - 703 с.
3. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. - М.: Медицина, 1985. - 464 с.
4. European Pharmacopoeia. - 5th ed. - Electronic version.
5. Pharmacopée Française. - Paris: Adrapharm, 1996.
6. Český Lescopis 1997. - Dopl. 2000. - Praga: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2000. - S. 5854-5857.
7. Deutsches Arzneibuch. - Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1998.
8. Pharmacopoea Helvetica. - 8th ed. - Berne: Département fédéral de l'intérieur, 1997.
9. WHO monographs on selected medicinal plants. - Geneva: World Health Organization, 2002. - Vol. 2. - P. 69-82.
10. Český Lescopis 1997. - 2 dil. - Praga: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1997. - S. 1491-1492.
11. European Pharmacopoeia. - 4th ed. - Strasbourg: Council of Europe, 2002. - 2416 p.
12. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989. - 400 с.

13. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Плоды боярышника» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасян Е.К., Хованская Н.П., Воловик В.Г., Георгиевский В.П. // Фармаком. - 2004. - № 4. - С. 27-35.

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

15. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.

Резюме

Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Питання введення в Державну Фармакопею України монографії «Глоду листя та квітки»

Проведено порівняльний аналіз показників якості квіток (та листя) глоду, що регламентуються ЄФ та ГФ XI. Показано, що дані статті є документами, що регламентують якість різних типів сировини. Досліджувана вітчизняна лікарська рослинна сировина за розділами «Вступна частина», «Макроскопія», «Мікроскопія», а також за фенольним складом (метод ТШХ) відповідає вимогам ЄФ. Запропоновано включити до національних вимог монографії ДФУ види продукуючої рослини, наведені в ГФ XI. Показано необхідність додаткових досліджень за показником «Кількісне визначення».

Summary

Kotov A.G., Kotova E.E., Tikhonenko T.M., Volovic V.G.

Matters of «Hawthorn leaf and flower» monograph introduction to the State Pharmacopoeia of Ukraine

Comparative analysis of hawthorn flower (and leaf) quality indices, regulated by EP and SP XI, was conducted. It was shown that these articles are documents, which regulated quality of different types of herbal drugs. Test domestic herbal drugs by such indices as «Definition», «Macroscopy», «Microscopy» and also by phenolic compound (TLC method), satisfies EP requirements. It was suggested to include in national requirements of SPU monographs species of generating plant, which were given in SP XI. The necessity of additional studies by the Assay was shown.

Котов Андрей Георгиевич (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ст. науч. сотр. сектора природных гетероциклических соединений ГП ГНЦЛС (2001). К.фарм.н. (1996). Ст. науч.сотр. (2004).

Котова Элина Эдуардовна. Окончила Харьковский государственный университет (1983). Науч.сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ.

Тихоненко Татьяна Михайловна. Окончила Харьковский государственный университет (1989) и Национальную фармацевтическую академию Украины. Работает в ГП НЭФЦ (с 1997). Науч. сотр. группы «Монографии на лекарственные субстанции» отдела ГФУ ГП НЭФЦ.

Воловик Виктор Григорьевич. Окончил Харьковский государственный университет. Науч. сотр. сектора химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

Фітохімічні дослідження

УДК 615.012-32:66.061.3-069.8

Добровольний О.О., Шаламай А.С.

Закрите акціонерне товариство «Науково-виробничий центр
«Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод»

Перспективи екстрагування лікарської рослинної сировини надкритичними газами

Запровадження надкритичних технологій у процесі екстрагування біологічно активних речовин із лікарської рослинної сировини, зокрема надкритичної CO₂ екстракції, дозволить відкрити широкі перспективи на шляху створення і виробництва сучасних високоефективних і безпечних вітчизняних фітопрепаратів.

На даний час в Україні традиційними способами виділення біологічно активних речовин із рослинної сировини є різні види екстрагування із застосуванням в якості екстрагентів органічних розчинників та їх сумішей, що потім видаляються при нагріванні екстрактів у вакуумі.

Сучасне технічне оснащення підприємств фармацевтичної галузі не завжди дозволяє застосувати м'які умови відгону розчинників з екстракту, що призводить до втрати летких та руйнування термолабільних компонентів.

Традиційно процеси екстрагування базуються на рівноважних процесах масопереносу (тверде тіло - рідина/рідина - тверде тіло) і виконуються шляхом перколяції або мацерації рослинної сировини в батареї перколяторів або настоюванням у реакторах. Існують різні конструкції реакторів, в яких задіяні такі технологічні принципи, як протиплинна та градієнтна екстракції, екстракція у поєднанні з фільтрацією екстрагенту — фільтраційна екстракція та ін. [7]. Промислове застосування цих методів у виробництві лікарських препаратів супроводжується низкою досить небезпечних та екологічно шкідливих факторів. Особливо проблематичним є виробництво із використанням горючих (петролейний ефір, гексан, бензин та ін.) та галогеновмісних вуглеводнів (хлористий метилен, хлороформ, ди-

хлоретан та ін.). У цих випадках якість екстрактів, а потім готових лікарських засобів має визначатися наявністю в них наведених вище залишкових токсичних розчинників. Саме зазначені розчинники, від яких важко позбавитися, використовуються для екстрагування ліпофільних речовин.

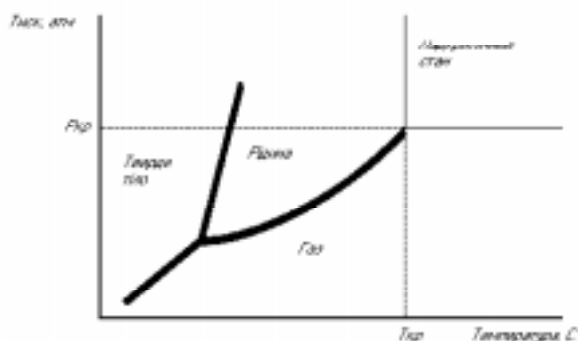
Впровадження у фармацевтичне виробництво норм і правил належної виробничої практики (GMP) та стандартів безпеки виробництва ISO 14000 вимагає використання нових безпечних та екологічно чистих технологій екстрагування рослинної сировини.

Одним із перспективних напрямків створення енергозберігаючих та безвідходних технологій є використання газів у надкритичних станах як екстрагентів біологічно активних речовин із лікарської сировини.

Надкритичні гази — флюїди, характеризуються параметрами фізичного стану, що перевищують критичні.

У надкритичному стані гази виявляють властивості рідин із надзвичайно високою розчинувальною здатністю. З іншого боку, надкритичні гази мають особливості газоподібного стану, що забезпечує високі масообмінні властивості. Так, за величиною в'язкості надкритичні гази наближаються до в'язкості газів, а коефіцієнт дифузії надкритичного газу більше ніж у 10 разів вищий коефіцієнта дифузії зви-

Рисунок 1



Діаграма переходу газу у надкритичний стан

чайних газів [5]. Порівняння цих величин наведено в Табл. 1.

Розчинювальна здатність надкритичних газів значно більше залежить від фізичних параметрів стану, ніж розчинювальна здатність звичайних органічних розчинників. Останнє дозволяє шляхом зміни лише тиску або температури регулювати екстрагуючу здатність розчинника і тим самим досягати високої вибірконості процесу екстрагування, а також виконувати повну регенерацію екстрагенту, не застосовуючи реагентні методи чи дистиляцію [3].

Принцип технології екстрагування надкритичним газом у найбільш застосовуваному варіанті ізотермічного процесу полягає у наступному: газ у надкритичному стані надзвичайно легко промиває шар твердого наповнювача — лікарської сировини, видаляючи з неї відповідні екстрактивні речовини. Після проходження надкритичним газом дросельного вентилля відбувається вирівнювання тиску, що призводить до втрати його розчинювальної здатності, і відбувається інтенсивне випаровування газу з екстракту. Очищений газ знову зріджується компресором і використовується у повторному екстрагуванні.

Слід відмітити такі переваги екстрагування надкритичним газом над класичними методами одержання екстрактів.

1. Енергозберігаючий фактор. Доказом цього є порівняння роботи, що витрачається на одержання зрідженого газу з енергетичними витратами на випарювання рідкого розчин-

ника. Так, робота зтиснення вуглецю діоксиду до тиску від 6 МПа до 20 МПа складає 54 Дж/кг, у той час як при температурі 20 °С теплота пароутворення становить 1189.0 кДж/кг [2].

2. Високі масообмінні характеристики процесу екстрагування. Із даних, наведених у Табл. 1, видно, що основні показники, які обумовлюють ефективність екстракції як масообмінного процесу, безумовно кращі у надкритичного газу. Таким чином, надкритичний газ може принципово краще, ніж звичайні розчинники, проникати у рослинні клітини, поглинати та транспортувати екстрактивні речовини.

3. Висока селективність виділення окремих компонентів. Маніпулюючи величинами тиску та температури надкритичного газу або вносячи у надкритичний газ у невеликій кількості органічні розчинники певної полярності, можна досягти виключної екстракції певного компонента рослинної сировини. Так, екстракція фосфоліпідів зі знежиреного лецитину надкритичним вуглекислим газом із 10 % вмістом етанолу демонструє його 95 % селективність по відношенню до фосфатиділхоліну [20].

4. Висока ступінь екстрагування і значна якість одержуваного продукту. Прикладом може бути екстрагування ваніліну із бобів: продукт, одержаний екстракцією надкритичним газом, містить близько 97 % ароматизуючих речовин, тоді як їх вміст в екстракті, одержаному водним етанолом, складає тільки 61 % [18].

Надкритичним вуглекислим газом видаляється значно більша кількість екстрактивних речовин хмелю, ніж дихлорметаном у класичному варіанті екстракції (α-кислот — 98.9 %, β-кислот 94.4 %, тоді як у другому випадку — 39.5 % та 42.5 %, відповідно) [4].

5. Відсутність залишкового розчинника. При класичній екстракції рідким екстрагентом обов'язковим є видалення з екстракту залишкового розчинника [4], вміст якого при виробництві лікарських препаратів регулюється ДФУ [22, 23].

6. Простота регенерації екстрагенту. Газ-екстрагент при зниженні тиску над екстрак-

Таблиця 1

Порівняльні характеристики фізичних параметрів газів, рідин, надкритичних газів

Показники	Газ	Рідина	Надкритичний газ
густина, кг/м ³	1	1000	100 - 800
в'язкість, сР	0.01	0.5 - 1.0	0.05 - 0.1
дифузія, мм ² s ⁻¹	1-10	0.001	0.01 - 0.1

Таблиця 2

Параметри критичних точок деяких газів

Назва газу	Температура критичної точки, °С	Тиск критичної точки, атм	Критична густина, г/см ³
азоту оксид	36.5	71.7	0.46
вуглецю діоксид	31.0	72.9	0.47
етан	32.2	48.2	0.2
етен	9.9	50.5	0.20
пропан	96.8	42.4	0.22
пропілен	91.9	45.4	0.22
трифторметан	25.9	46.9	0.52

том випаровується і, пройшовши крізь пористу поверхню, знову стискується компресором до рідкого стану [15].

7. Нетоксичність та хімічна інертність використання екстрагентів.

В Табл. 2 наведені параметри критичних станів газів, що можливо використовувати в екстрагуванні.

Незважаючи на оптимуми фізико-хімічних характеристик зазначених газів та ефективність їх в екстракції рослинної сировини, переваги, наведені нижче, має вуглекислий газ:

CO₂ — фізіологічно безпечний;

CO₂ — не горить, не підтримує горіння, не відноситься до вибухонебезпечних газів;

CO₂ — безпечний для навколишнього середовища, не дає екологічно шкідливих відходів;

CO₂ — стерильний, бактеріостатичний;

CO₂ — недорогий, для виробничих потреб доступний у великих кількостях.

Вуглекислий газ, як екстрагент, у надкритичному стані дозволяє віділити з рослинної сировини досить широкий спектр біологічно активних речовин різної хімічної будови [6].

Надзвичайно важливо те, що за технологією екстрагування із використанням надкритичного вуглекислого газу відбувається в надзвичайно м'яких умовах, що дозволяє одержувати досить лабільні органічні сполуки з високою чистотою. Висока розчинювальна здатність надкритичного вуглекислого газу є запорукою того, що можна екстрагувати речовини із широким діапазоном їх фізико-хімічних характеристик: від мономерних агліконів до їх глікозидів, сполуки з ліпофільними та гідрофільними властивостями та ін. Будова молекули вуглекислого газу характеризує цю речовину як неполярну, але в надкритичному стані вона має деяку органічну спорідненість із полярними молекулами в результаті утворення макромолекул кластерів. Надкритичний вуглекислий газ дозволяє відокремити бажані складові, виключаючи можливість наявності токсичних залишків розчинника в екстракті.

Введення в надкритичний вуглекислий газ органічних розчинників у надзвичайно малій кількості призводить до суттєвого збільшення екстрагуючої потужності екстрагента, а отже — до зміни селективності екстрагування. При цьому стає можливим збагачення екстракту найбільш бажаним компонентом зі збільшенням його кількості, що впливає на економічні показники виробництва [11].

Таблиця 3

Екстрагуюча властивість надкритичного вуглекислого газу

№	Група БАР	Розчинювальна здатність
1.	вуглеводні	±
2.	каротиноїди	+
3.	дигліцериди	+
4.	моногліцериди	+
5.	стерини	+
6.	фосфоліпіди	+
7.	токофероли	+
8.	терпеноїди	+
9.	альдегіди, кетони	+
10.	складні ефіри	+
11.	флавонові аглікони	+
12.	спирти	+
13.	амінокислоти	+
14.	органічні кислоти	+
15.	вуглеводи	+
16.	алкалоїди	+
17.	дубильні речовини	+
18.	фенольні сполуки	+
19.	глікозиди	+
20.	мінеральні речовини	-
21.	полісахариди	-
22.	олігосахариди	-
23.	білки, пептиди	-
24.	пектини	-

Примітки:

+ — екстрагує повністю;

- — не екстрагує;

± — частково екстрагує.

Наприклад, при екстрагуванні фосфоліпідів чистим надкритичним вуглекислим газом процес йде поверхнево. Це пояснюється неполярною природою екстрактивних речовин. Присутність етанолу як модифікатора (співрозчинника) екстрагування демонструє явну селективність виділення фосфатидіхоліну із суми фосфоліпідів [20].

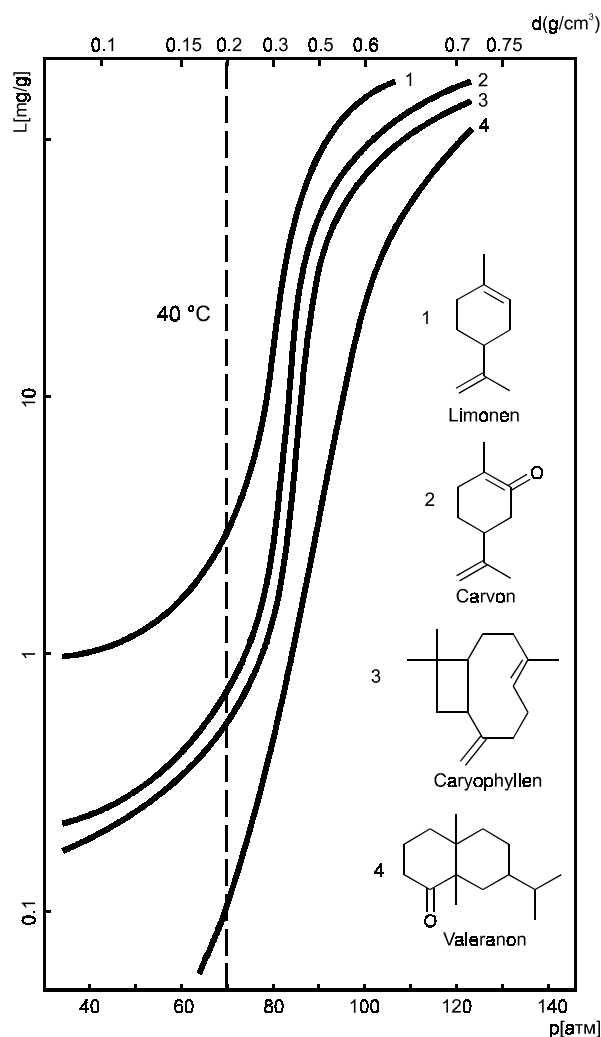
Слід відмітити, що якість ліпідів, одержаних шляхом екстрагування надкритичним газом, значно вища ніж якість ліпідів, одержаних із використанням класичної екстракції [9].

Якщо звернути увагу на ізотерми розчинності типових компонентів ефірних олій (Рис. 2), стає очевидним, що в області слабкої надкритики, тобто за тиску від 70 атм до 100 атм та температурі 40 °С за рахунок підвищення густини екстрагенту їх розчинність стрімко зростає, майже до повного змішування.

Селективна екстракція ефірних олій надкритичним вуглекислим газом можлива за густини газу між 0.4 г/см³ та 0.6 г/см³. У цій області не виявляються ефекти фракціювання всередині олії, так як її компоненти мають високі значення розчинності. У зв'язку з цим слід згадати властивості надкритичної екстракції терпенів, що, як відомо, є нестабільними сполуками, продукти розпаду яких зумовлюють небажані зміни властивостей готових продуктів. В окремих випадках необхідно виділити не тільки монотерпенові, а й сесквітерпенові вуглеводні та важколетючі супутні речовини. Одержання чистих ароматичних речовин з ефірних олій потребує другого етапу розділення, за якого переваги має насичення водою надкритичного вуглекислого газу. Одержані екстракти відрізняються від традиційних тим, що мають у своєму складі сполуки, які не зазнали ніяких змін, що абсолютно неможливо за традиційних методів екстракції. Так, одержаний надкритичним СО₂ екстракт ромашки, містить у своєму складі матрицин, бісаболол, лаурел та А і Б оксиди бісабололу. Деякі спеціалісти вважають основною діючою речовиною екстракту ромашки хемазулен - сполуку, яка надає синього кольору ефірній олії ромашки. При цьому не враховується той факт, що хемазулен є продуктом розпаду матрицину і має нижчу фармакологічну активність у порівнянні з останнім [1, 12, 13].

Також встановлено, що ефірні олії та комплекси жирних кислот, одержані за допомогою технологій екстрагування надкритичним СО₂, виявляють значну антиоксидантну активність, зумовлену супутньо вилученими біо-

Рисунок 2



Ізотерми розчинності типових компонентів ефірних олій у надкритичному вуглекислому газі

логічно активними речовинами — карнозолом, кумарином, кверцетинном, хемазуленом та ін. [12, 13]. Зокрема, було показано, що антиоксидантні властивості ефірних олій із різних видів деревію обумовлені саме наявністю в них хемазулену [8].

Останнім часом підвищений інтерес із боку косметології до сквалену спонукав до пошуку нових джерел та технологій його одержання. Відомо, що донині сквален одержували з печінки акул, що є досить дорогим способом. У невеликих кількостях сквален наявний у дріжджах, олії зародків пшениці, у рисовій дерті. Останнім часом ця проблема знайшла своє вирішення: було розроблено ефективний спосіб одержання сквалену та фітостероїдів шляхом екстрагування його надкритичним газом із пальмової та маслинової олій за їх вмісті

у зазначених оліях як субпродуктів у кількостях 200-600 ppm [16, 14, 10]. Запропоновано також способи одержання сквалену з кори хінного дерева [21] та трави ефедри [17].

Досить важливими висновками дослідження надкритичних флюїдних екстрактів є те, що вони виявляють значно вищі антиоксидантні властивості, ніж екстракти одержані класичними методами екстрагування лікарських рослин [19].

Висновки

Технологія екстрагування лікарської рослинної сировини надкритичними газами і, зокрема, надкритичним вуглекислим газом, є новим методом виділення біологічно активних речовин і, таким чином, одержання екстрактів принципово нового якісного рівня. Це дозволяє розширити номенклатуру оригінальних вітчизняних фітопрепаратів, виробляючи їх саме в умовах належної виробничої практики. Ця технологія найбільш сприятлива для виробництва лікарських засобів завдяки раціональному використанню рослинної сировини, екологічній безпечності та економічній привабливості.

ЛІТЕРАТУРА

1. Экспертная оценка антиоксидантной активности растительного сырья / Абдулин И.Ф., Чернышева Н.Н., Турова Е.Н. и др. // Сырье и упаковка. - 2002. - № 9 (28). - С. 24-26.
2. Банашек В.Э., Бугаева О.П., Солодков В.В. и др. // Обзорная информация. - 1989. - Вып. 5. - С. 1-2.
3. Дадашев М.Н., Абдулагатов А.И., Исаева Э.К. // Оборонный комплекс - научно-техническому прогрессу России. - 1998. - № 1-2. - С. 40-45.
4. Жузе Т.П. Роль сжатых газов как растворителей. - М.: Недра, 1981. - 165 с.
5. Пичугин А.А., Тарасов В.В. // Успехи химии. - 1991. - Т. 60. - Вып. II. - С. 2412.
6. Попова И.Ю., Водяник А.Р. О растворяющей способности сверхкритического углекислого газа // Рынок БАД. - 2003. - № 3 (II). - С. 30-33.
7. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств: Учебник для слушателей институтов, факультетов повышения квалификации специалистов фармации: В 2 т. / И.М. Перцев, И.А. Зупанец, Л.Д. Шевченко и др. / Под ред. И.М. Перцева, И.А. Зупанца. - Т. 2. - Х.: Изд-во НФаУ, 1999. - 448 с.
8. Яцюк В.Я., Сидоренко А.Ф., Сухомлинов Ю.А. Антиоксидантні властивості ефірних олій різних видів деревію // Фармацевтичний журнал. - 1995. - № 6. - С. 68-70.
9. Cansell F., Petitot J-P. Fluides supercritiques et materiaux // France: LIMHP. - 1995. - P. 372.
10. Production of Phytonutrients (carotenes, vitamin E, sterols, squalene, co-enzyme Q and phospholipides) from palm methyl esters (Malaysian Palm Oil Board) / Choo Y.M., Lau H.L.N., Puah C.W. et al. // <http://mpob.gov.my>.
11. Cygnarowicz - Provost M., O'Brien D.J., Boswell R.T., Kurantz M.J. // J. Supercritical fluids. - 1995. - Vol. 8, No. 1. - P. 51.
12. Derrida M. Nervous system benefits of rosemary antioxidant // www.ccba.bc.cf.discucc1.
13. Derrida M. Seabuckthorn seed oil antioxidant - natural rosmay antioxidant // www.ccba.bc.cf.discucc1.
14. Dilp.-Ing. D. Bul. Properties and Application of Squalene and its Separation from Olive Oil Deodorizer Distillates // www.tu-harburg.de.
15. Eggers R. // Verfahrenstechnik. - 1986. - Vol. 20, No. 3. - P. 30.
16. Ibanes E., Palacios J. // J. Am. Oil Chem. Society. - 2000. - Vol. 77. - P. 839.
17. Kaiser C.S., Rompp H., Schmidt P.C. Pharmaceutical application of carbon dioxide // Pharmazie. - 2001. - B. 56. - S. 12.
18. Ngyen K., Barton P., Spenser J.S. // J. Supercritical fluids. - 1991. - Vol. 4, No. 1. - P. 40.
19. Grape-Derived Extracts via Supercritical Fluids / Taylor L.T., Khorassani V.A., Palma M. et al. // 92nd AOCS Annual Meeting & Expo Abstracts. - Minneapolis, 2001. - Vol. 12. - P. 183.
20. Teberikler L., Koseoglu S.S., Akgerman A. Modeling of selective extraction of phosphatidyl choline from a complex lecithin mixture using supercritical CO₂/ethanol // J. of Food Lipids. - 2003. - Vol. 10, No. 3. - P. 203-218.
21. Ting Yi, Yong-Chien Ling // J. of Food and Drugs Analysis. - 2000. - Vol. 8, No. 4. - P. 235-247.
22. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - 531 с.
23. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.

Резюме

Добровольный А.А., Шаламай А. С.

Перспективы экстрагирования лекарственного растительного сырья сверхкритическими газами

Внедрение сверхкритических технологий в процессе экстрагирования биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья, в частности сверхкритической CO₂ экстракции, позволит открыть широкие перспективы на пути создания и производства современных высокоэффективных и безопасных отечественных фитопрепаратов.

Summary

Dobrovolny A.A., Shalamay A.S.

Prospects of herbal drugs extraction by supercritical gases

Introduction of supercritical technologies in the process of extraction of biologically active substances from herbal drugs, particularly supercritical CO₂ extraction, will allow to open wide prospects on the part to creation and manufacture of new high-performance and safe domestic phytopreparations.

Добровольний Олександр Олександрович. Закінчив Національний фармацевтичний університет (2004). Інженер дослідно-впроваджувальної лабораторії ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод».

Шаламай Анатолій Севастьянович. Закінчив Київський національний університет ім. Т.Г. Шевченка (1967). Працює на ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (від 1994). Заступник Генерального директора з науки (1997). К.х.н. (1981). Старший науковий співробітник.

УДК 615.711.5

Комиссаренко С.Н.

Национальный фармацевтический университет

Карденолидные гликозиды семян *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. орнитогалин и родексин А

Из семян *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. выделены шесть веществ, из которых идентифицированы два гликозида карденолидной природы. На основании физико-химического анализа выделенных веществ и продуктов их превращения гликозиды определены как 3 β -(О- β -D-глюкопиранозил)-14 β -гидрокси-кард-4,20(22)-диенолид (орнитогалин) и 3 β -(О- α -L-рамнопиранозил)-11 α ,14 β -дигидрокси-5 β -кард-20(22)-енолид (родексин А). Орнитогалин и родексин А из семян *O. magnum* Krasch. et Schischk. выделены впервые.

Птицемлечник крупный (*O. magnum* Krasch. et Schischk. сем. *Liliaceae* Hell.) является эндемичным луковичным растением, которое распространено в Предкавказье и Восточном Закавказье. Произрастает в лесах, кустарниках и на виноградниках [7].

Ранее из коробочек птицемлечника крупного был выделен ряд карденолидных гликозидов [2-4].

Предварительными исследованиями было установлено, что семена птицемлечника крупного также содержат вещества карденолидной природы.

Целью настоящей работы является обобщение результатов изучения карденолидов семян птицемлечника крупного (*O. magnum* Krasch. et Schischk.).

Экспериментальная часть

Объектом настоящего исследования были семена *O. magnum* Krasch. et Schischk., собранные в Предкавказье в пойме реки Белой.

Силикагель для хроматографии готовили, как описано в работе [1]. Температуру плавления определяли на блоке Кофлера. Вещества для анализа высушивали в вакууме над P₂O₅ при температуре 110 °С в течение 5 ч. Данные элементного анализа всех соединений соответствовали вычисленным.

Выделение вещества 1 (орнитогалин) и вещества 2 (родексин А).

1,8 кг измельченных семян птицемлечника крупного экстрагировали 80 % этанолом до полного извлечения карденолидов. Полученный экстракт упаривали до объема 350 мл и очищали хлороформом, водный остаток фильтровали через слой неактивного алюминия оксида (h = 10 см, d = 4 см) с последующим вымыванием гликозидов водой. Водный фильтрат (600 мл) обрабатывали хлороформно-спиртовыми смесями (3:1) и (2:1). В данной статье приведены сведения о выделении карденолидов из первой фракции. Для этого ее упаривали до удаления растворителей.

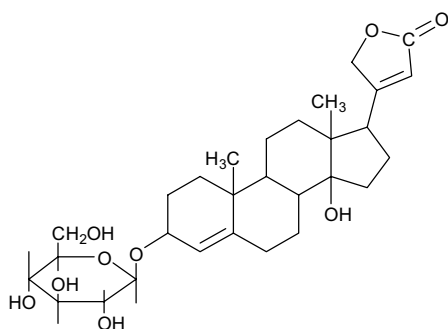
После упаривания получено 14 г сухого остатка, который растворяли в хлороформе с 5 % спирта и наносили на колонку силикагеля с 5 % гипса (h = 60 см, d = 4 см). В качестве неподвижной фазы использовали воду. Колонку промывали смесью бензола с метилэтилкетонном с постепенным увеличением концентрации последнего от 5 % до 50 % по объему. Гликозидный состав каждой фракции (150 мл) анализировали хроматографией на бумаге в системах растворителей толуол - н.бутанол (3:1)/вода (35 %) и толуол - н.бутанол (2:1)/вода (35 %). Фракции, имеющие одинаковый карденолидный состав, объединяли, упаривали и кристаллизовали. В результате было получено шесть индивидуальных веществ карденолидной природы. Исследованы два (1 и 2) из этих веществ. Сведения о других полученных веществах будут представлены в следующих публикациях.

После упаривания хлороформно-спиртовой фракции (2:1) получено 8 г сухого остатка суммы гликозидов, богатых сахарами, которые будут исследованы после изучения карденолидов хлороформно-спиртовой фракции (3:1).

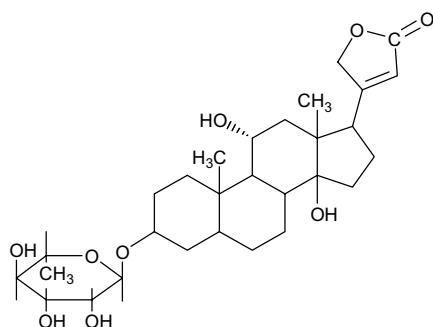
Вещество 1 (орнитогалин). Гликозид кристаллизуется из воды и метанола в виде игольчатых кристаллов с т.пл. (208-214) °С, $[\alpha]_D^{21} + 22$ (с. 0.1; этанол). Элементный состав C₂₉H₄₂O₉.

С 84 % раствором кислоты серной вещество образует переходящие во времени окраски, мин: 0 — коричневую, 1-3 — грязно-фиолетовую, 4-60 — фиолетовую. Оно дает положительные реакции Легала и Раймонда [9].

Гидролиз орнитогалина ферментами виноградной улитки. 70 мг вещества гидролизовали таким же количеством фермента, продукты гидролиза обрабатывали по методике [2]. Выделен в кристаллической форме агликон (29 мг) и сахарный компонент (11 мг) исследуемого гликозида. Полученный при гид-



Орнитогалин (1)



Родексин А (2)

ролизе сахарный компонент плавится при температуре (160-163) °С, при параллельном хроматографировании с достоверным образцом он идентифицирован как D-глюкоза.

Агликон орнитогалина кристаллизовали из смеси ацетон-диэтиловый эфир. Выпавшие при медленном испарении растворителей кристаллы плавилась при температуре (135-141) °С/(222-227) °С, $[\alpha]_D^{21} + 29^\circ$ (с. 0.1; этанол). Элементный состав — $C_{23}H_{32}O_4$.

С 84 % раствором кислоты серной вещество образует переходящие во времени окраски, мин: 0 — красноватую, 1-2 — красно-фиолетовую, 60 — черновато-фиолетовую.

Реакция на Δ^4 и Δ^5 связи [3]. Использовали реактивы: 1. жидкий фенол, 2. смесь 1 г молибдата аммония, 2.5 мл 60 % раствора кислоты хлорной в 100 мл 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Бумагу с нанесенным на нее раствором орнитогалина опрыскивали вначале реактивом 1, затем реактивом 2. После каждого опрыскивания бумагу высушивали при температуре 80 °С. На месте нанесения вещества появилось ярко-голубое пятно. В качестве веществ сравнения использовали 5-ангидрострофантин (пахигенин) и 4-ангидрострофатидин (гирканогенин) [3].

Вещество 2 (родексин А). Кристаллизуется из спирта и воды в форме бесцветных игл

(375 мг) с т.пл. (248-251) °С, $[\alpha]_D^{20} - 24^\circ$ (с. 1.0; метанол).

С 84 % раствором кислоты серной вещество образует переходящие во времени окраски, мин: 1 — красновато-коричневую, 10-15 — синевато-зеленую, 30-45 — зеленовато-синюю, 60 — светло-зеленую, 90 — зеленовато-серую.

Кислотный гидролиз вещества 2. 120 мг вещества 2 растворяли в 15 мл ацетона безводного, затем прибавляли 0.15 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Полноту гидролиза контролировали хроматографированием на бумаге в системе растворителей хлороформ - формамид. На пятые сутки исходное вещество на хроматограмме не обнаруживалось. В дальнейшем гидролизат обрабатывали способом, указанным в [3].

Сахарный компонент вещества 2. Из водного остатка после отделения агликона хлороформом хлор-ион удаляли 2.0 г анионита АВ-17. Затем анионит отфильтровывали, фильтрат упаривали до сиропообразного остатка, который кристаллизовали из ацетона, увлажненного несколькими каплями воды. Полученные кристаллы (21 мг) плавилась при температуре (74-77) °С и при хроматографировании на бумаге были идентифицированы с L-рамнозой.

Агликон вещества 2. Хлороформное извлечение кислотного гидролизата вещества 2 упаривали до сухого остатка, который кристаллизовали из смеси растворителей метанол-эфир. Получено 50 мг игольчатых кристаллов, плавящихся при температуре (264-271) °С, $[\alpha]_D^{20} + 21.6$ (с. 0.92; метанол) и имеет общую формулу $C_{23}H_{34}O_5$.

С 84 % раствором кислоты серной вещество образует переходящие во времени окраски, мин.: 1 — желтоватую, 10 — желтовато-коричневую с зеленовато-голубой каймой, 15 — коричневатозеленую, 30 — желто-синюю, 40-60 — желто-зеленую, 90-120 — ярко-зеленую.

После опрыскивания хроматограммы 20 % раствором сурьмы(III) хлоридом в хлороформе с последующим нагреванием в течение 5 мин при температуре (100-105) °С пятно агликона флуоресцирует в УФ-свете голубым цветом.

Хроматографирование на бумаге, цветные реакции с 84 % раствором кислоты серной, физико-химические свойства и проба смешения свидетельствуют об идентичности исследуемого агликона сарментогенину (3 β ,11 α ,14 β -тригидрокси-5 β -кард-20(22)-енолиду).

Результаты и их обсуждение

Предварительными исследованиями семян птицемлечника крупного было установлено, что они содержат стероидные вещества карденолидной группы.

Для выделения этой группы веществ измельченные семена экстрагировали 80 % спиртом. После отгонки спирта водный остаток очищали от сопутствующих веществ, затем сумму гликозидов фракционировали хлороформно-спиртовыми (3:1) и (2:1) смесями.

После разделения суммы гликозидов первой фракции методом распределительной хроматографии на силикагеле с 5 % гипса получено шесть веществ карденолидной природы, из которых два идентифицированы.

Вещество 1 (орнитогалин) хорошо расщепляется ферментами виноградной улитки на D-глюкозу и агликон состава $C_{23}H_{32}O_4$, который по величине R_f в различных системах растворителей близок к дигитоксигенину и узаригенину. Агликон не восстанавливается боргидридом натрия, что указывает на отсутствие карбонильной группы. Как агликон, так и гликозид (1) дают положительную реакцию, характерную для Δ^4 - и Δ^5 -связей [3] в стероидном скелете. Как гликозид, так и агликон имеют плавную положительную кривую спектра дисперсии оптического вращения (Рисунок).

Агликон по молекулярной массе, элементному составу, параллельному хроматографированию в ряде систем растворителей, спектру дисперсии оптического вращения идентичен канаригенину (3 β ,14 β -дигидрокси-кард-4,20(22)-диенолид), который ранее был обнаружен при гидролизе сердечного гликозида орнитогалина [4], выделенного из коробочек птицемлечника крупного [2].

В исследуемом гликозиде согласно правилу Кляйна [8] определена β -гликозидная связь.

Исходя из полученных данных, структуру вещества можно представить как 3 β (O- β -D-глюкопиранозил)-14 β -гидрокси-кард-4,20(22)-диенолид, что идентично орнитогалину, ранее выделенному из коробочек орнитогала большого [4].

Вещество (2). Родексин А. Для идентификации данного вещества проведен кислотный гидролиз [2]. В результате получен сахар L-рамноза и агликон с общей формулой $C_{23}H_{34}O_5$. В его УФ-спектре имеется один максимум при длине волны 219 нм ($Lg\epsilon$ 4.20), характерный для ненасыщенного пятичленного лактонного кольца у C_{17} . В агликоне определены три гидроксильные группы, две из которых способны ацетилироваться. По физико-химическим свойствам, цветным реакциям с 84 % раствором кислоты серной и голубой флуоресценции при взаимодействии с раствором $SbCl_3$ и величинам R_f в различных системах растворителей агликон вещества (2) идентифицирован с сарментогенином (3 β ,11 α ,14 β -тригидрокси-5 β -кард-20(22)-енолидом), а гликозид - 3 β (O- α -L-рамнопиранозил)-11 α ,14 β -дигидрокси-5 β -кард-20(22)-енолидом - с родексином А [2].

Выводы

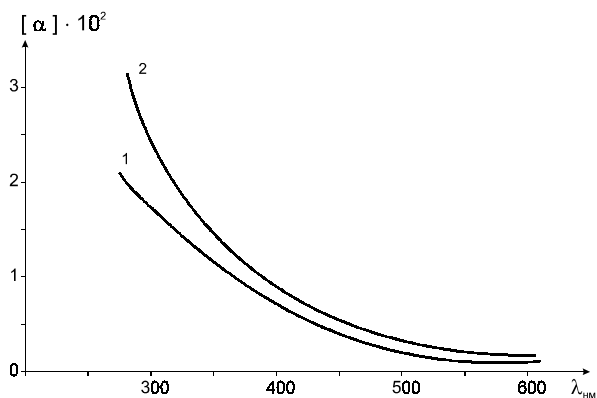
В семенах птицемлечника крупного *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. обнаружены сердечные гликозиды карденолидной группы.

Методом распределительной хроматографии на силикагеле с 5 % гипса выделены шесть гликозидов, из которых идентифицированы два: орнитогалин 3 β -(O- β -D-глюкопиранозил)-14 β -гидрокси-кард-4,20(22)-диенолид и родоксин А 3 β -(O- α -L-рамнопиранозил)-11 α ,14 β -дигидрокси-5 β -кард-20(22)-енолид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А.Н., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. - М., 1964. - С. 16.
2. Комиссаренко Н.Ф. Карденолиды коробочек *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. // Химия природных соединений. - 1965. - № 3. - С. 155.
3. Комиссаренко Н.Ф. Орнитогалозид - новый карденолидный гликозид *Ornithogalum magnum*. // Там же. - 1969. - № 3. - С. 142.
4. Комиссаренко Н.Ф. Орнитогалин - карденолидный гликозид *Ornithogalum magnum* // Там же. - 1971. - № 1. - С. 38.
5. Комиссаренко Н.Ф., Чернобай В.Т., Колесников Д.Г. Сердечные гликозиды ландыша дальневосточного *Convallaria Keiskei* Miq. // Медицинская промышленность СССР. - 1961. - № 1. - С. 12.
6. Комиссаренко Н.Ф., Белецкий Ю.Н., Ковалев И.П., Д.Г. Колесников Д.Г. Скорпиозид - новый карденолидный

Рисунок



Спектр дисперсии оптического вращения (с 0.1; этанол) орнитогалина (1) и агликона орнитогалина (2)

гликозид из *Coronilla scorpioides* // Химия природных соединений. — 1969. - № 5. - С. 381.

7. Крашенинников И.М. Род *Ornithogalum* L. — Птице-млечник // Флора СССР. — 1935. - Т. 4. - 380 с.

8. Klyne W. The Configuration of the Anomeric Carbon Atom in some Cardiac // *Biochem.* - 1950. - Vol. 44, No. 4. — P. 41.

9. Paech K., Tracey M.K. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.* — Bd. 3. - Berlin-Gettingen-Hetdelberg, 1955. - S. 218.

Резюме

Комісаренко С.М.

Карденолідні глікозиди насіння *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. орнітогалін та родексин А

Із насіння *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. виділено шість речовин, із яких ідентифіковано два глікозиди карденолідної природи. На основі фізико-хімічного аналізу виділених речовин і продуктів їх перетворення глікозиди було визначено як 3β-(О-β-D-глюкопіранозил)-14β-гідрокси-кард-4,20(22)-дієнолід (орнітогалін) і 3β-(О-α-L-рамнопіранозил)-11α,14β-дигідрокси-5β-кард-

20(22)-єнолід (родексин А). Орнітогалін і родексин А із насіння *O. magnum* Krasch. et Schischk. виділено вперше.

Summary

Komissarenko S.N.

Kardenolid glycosides of *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. seeds ornithogalin and rodexin A

From *Ornithogalum magnum* Krasch. et Schischk. seeds six substances, two of which have kardenolid nature, were isolated. At the base of physicochemical analysis of isolated substances and their transmutation products, glycosides were considered as 3β-(O-β-D-glucopyranosyl)-14β-hydroxy-card-4,20(22)-dienolid (ornithogalin) and 3β-(O-α-L-rhamnopyranosyl)-11α, 14β-dihydroxy-5β-card-20(22)-enolid (rodexin A). Ornithogalin and rodexin A from *O. Magnum* seeds were isolated for the first time.

Комиссаренко Сергей Николаевич. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1989). К.фарм.н. (2002). Ассистент кафедры фармакогнозии НФаУ.

Аналіз

УДК: 547.455.623'233.1

Зупанець І.А., Шебеко С.К.

Національний фармацевтичний університет

Уніфікація методів кількісного визначення ендogenous глюкозаміну в біологічному матеріалі

Розглянуто можливості застосування методів, заснованих на реакції Ельсона-Моргана, для кількісного визначення ендogenous глюкозаміну у тканинах та сироватці крові. Визначено, що переважна більшість цих методів має деякі недоліки, основним з яких є заниження результатів через руйнування аміноцукрів у процесі кількісного визначення. Запропоновано паралельно з досліджуваними пробами використовувати стандартний розчин N-ацетилглюкозаміну з концентрацією, близькою до його прогнозованого вмісту в біологічному матеріалі. Це дозволило значно знизити систематичну похибку визначення та покращити ступінь виявлення гексозаміну.

Кількісний вміст ендogenous аміноцукрів у сироватці крові та тканинах різних органів є хоча і неспецифічним, але досить інформативним клініко-діагностичним показником, що відображає перебіг запально-деструктивних процесів в організмі людини та дозволяє робити висновки щодо ефективності фармакотерапії. Загальновідома тенденція, згідно з якою при розвитку запальних процесів відмічається зниження вмісту гексозамінів у відповідних органах та підвищення їх рівня у сироватці крові. Це пояснюється тим, що основною фізіологічною функцією аміноцукрів є пластична функція. Вони у складі протеогліканів, глікозаміногліканів, ліпополісахаридів входять до біомембран, міжклітинної речовини, матриксу суглобового хряща та інших структур сполучнотканинного походження [1-3].

Найбільш поширеним аміноцукром у природі є глюкозамін, який в організмі людини

міститься у вигляді N-похідного, що і є його біологічно активною формою [4, 5]. Частка N-ацетилглюкозаміну (N-ацГА) у тканинах органів складає 95 - 99 % від загального вмісту гексозамінів [4, 6], у сироватці крові — 90 - 93 %; решту частку складає переважно N-ацетилгалактозамін [7]. У зв'язку з цим у більшості досліджень під кількісним визначенням N-ацГА насправді мають на увазі загальний вміст аміноцукрів, і, на наш погляд, у ракурсі маркерів запалення ці поняття можна вважати рівнозначними.

Більшість існуючих методів кількісного визначення аміноцукрів у біологічному матеріалі засновано на реакції Ельсона - Моргана [4, 6, 8]. Вона являє собою взаємодію аміноцукру з ацетилацетоном у лужному середовищі при температурі 100 °С з утворенням хромогенної сполуки, яка далі реагує з пара-диметиламінобензальдегідом у кислому спиртово-

му середовищі з утворенням розчину інтенсивного вишнево-червоного кольору (із максимумом поглинання за довжини хвилі 530 нм), за яким концентрацію речовини визначають фотометрично за калібрувальними кривими [4]. При цьому дуже важливо, щоб під час визначення стандартні калібрувальні проби знаходилися у тих самих умовах, що й досліджувані проби, оскільки це значно впливає на інтенсивність забарвлення [9].

Даний метод придатний тільки для визначення загального вмісту незв'язаних гексозамінів із вільною аміногрупою, тому є недостатньо специфічним [8, 9]. При визначенні вмісту аміноцукрів у біологічному матеріалі на попередньому етапі реакції необхідно проводити кислотний гідроліз при високій температурі, оскільки більшість із аміноцукрів міститься у складі біополімерів. Для кількісного визначення фракції, зв'язаної з білками, безпосередньо перед гідролізом її відокремлюють осадженням кислотою трихлороцтовою з подальшим переводом осаду у розчин під дією луку [1].

Визначенню аміноцукрів даним методом заважає одночасна присутність цукрів та амінокислот, особливо лізину, які теж утворюють забарвлення червоного кольору (із максимумом поглинання за довжини хвилі 560 нм) і не дають його окремо один від одного [4, 10]. Через деякий час інтенсивність цього забарвлення значно зменшується [8]. Таким чином, при визначенні загальної фракції аміноцукрів у сироватці крові, де також неминує знаходяться цукри та амінокислоти, може відбуватися деяке завищення результатів.

Існує велика кількість модифікацій методу Ельсона-Моргана, більшість з яких полягає у підборі оптимальних умов перебігу гідролітичного вивільнення аміноцукрів та самої реакції, за яких втрати гексозамінів були б мінімальними. Це пов'язано з низькою хімічною стійкістю аміноцукрів, що руйнуються, як правило, шляхом дезамінування при високій температурі або при потраплянні у лужне чи сильнокисле середовище [4, 7, 10]. Так, за даними деяких авторів, на різних етапах цього методу загальні втрати гексозамінів сягають 12 % [9].

Раніше нами описано модифікацію, у якій підібрано оптимальні умови гідролітичного вивільнення аміноцукрів із біополімерів і кількість біологічного матеріалу (0.5 мл сироватки крові та 100 мг гомогенату тканини). Гідроліз сироватки крові проводили 25 % розчином кислоти хлористоводневої протягом

3 год при температурі 100 °С, для тканин органів використовували 50 % розчин кислоти хлористоводневої [1]. Завдяки цьому було досягнуто максимальну повноту вивільнення аміноцукрів за мінімальних втрат, але певна кількість їх неминує руйнується.

На нашу думку вирішенням цієї проблеми може бути використання у процесі кількісного визначення стандартного розчину N-ацГА з концентрацією, наближеною до фізіологічної, який би проходив крізь усі стадії реакції у тих самих умовах, що й біологічні проби. Із цією метою нами було дещо модифіковано попередню методику та проведено порівняльний аналіз результатів із використанням стандартного розчину та за допомогою калібрувальних кривих.

Матеріали та методи

Розчин ацетилацетону. 1 мл ацетилацетону розчиняють у 30 мл 0.5 М розчину натрію карбонату, що гарантує оптимальне рН середовища (близько 9.7 - 9.8). Реактив нестійкий, його готують безпосередньо перед використанням.

Реактив Ерліха. 0.8 г пара-диметиламінобензальдегіду розчиняють у суміші 15 мл етанолу та 15 мл кислоти хлористоводневої концентрованої на льодяній бані. Реактив зберігає стійкість протягом декількох годин при температурі не вище 10 °С.

Стандартні розчини глюкозаміну. Для приготування використовували хімічно чистий глюкозаміну гідрохлорид (фірма «Protein Chemical Co.», Японія). Готували розчини з концентраціями від 0.05 ммоль/л до 1.0 ммоль/л.

Стандартні розчини N-ацетилглюкозаміну. Використовували розчини N-ацетилглюкозаміну (фірма «Protein Chemical Co.», Японія) із концентраціями 5.0 ммоль/л та 7.0 ммоль/л (розчини А і Б, відповідно), що відображають діапазон його фізіологічного вмісту у сироватці крові людини [1, 6, 11].

Хід визначення. 0.5 мл проби поміщали у центрифужну пробірку, додавали 5 мл 10 % розчину кислоти трихлороцтової, центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв та декантували надосадову рідину. До осаду додавали 0.5 М розчин калію гідроксиду до об'єму 1 мл і перемішували до повного розчинення. Рідину переносили в ампулу, додавали 5 мл 3 М розчину кислоти хлористоводневої, ампулу запаявали. Розчин гідролізували протягом 3 год при температурі 100 °С (на киплячій водяній бані), після чого ампули розкривали, їх вміст нейтралізували 5 мл 3 М розчину натрію гідроксиду.

У разі визначення загального вмісту аміноцукру 0.5 мл проби поміщали в ампулу, додавали 0.5 мл води дистильованої, 5 мл 3 М розчину кислоти хлористоводневої, ампулу запаювали та далі діяли за вищезазначеною методикою.

2 мл нейтралізованої суміші переносили у пробірку із притертою пробкою, додавали 1 мл розчину ацетилацетону, щільно закривали та нагрівали на киплячій водяній бані протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл етанолу, 1 мл реактиву Ерліха і залишали розчин на 1 год у темному місті при кімнатній температурі для розвитку забарвлення.

Для приготування контрольної проби використовували 2 мл води дистильованої.

Оптичну густину вимірювали на фотоелектроколориметрі КФК-2МП при зеленому світлофільтрі ($\lambda = 540$ нм) у кюветах із товщиною шару 1 см проти контрольного розчину.

Подальший розрахунок кількісного вмісту аміноцукру проводили двома методами: за допомогою калібрувального графіка (I метод) та із використанням стандартних розчинів А і В N-ацГА (II метод).

Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини глюкозаміну гідрохлориду з концентраціями від 0.05 ммоль/л до 1.0 ммоль/л, що готували аналогічно контрольній пробі.

5.0 мМ та 7.0 мМ розчини N-ацГА використовували як стандарти з відомою концентрацією, що проходили паралельно з досліджуваними пробами крізь усі стадії кількісного визначення, починаючи з кислотного гідролізу. Для цього 0.5 мл розчину поміщали в ампулу, додавали 0.5 мл води дистильованої, 5 мл 3 М розчину кислоти хлористоводневої, ампулу запаювали та нагрівали на киплячій водяній бані протягом 3 год. Далі діяли за вищезазначеною загальною методикою.

Вміст N-ацГА, у ммоль/л, обчислювали за формулою:

$$C_1 = \frac{A_1}{A_2 \cdot C_2},$$

де:

A_1 та A_2 — оптична густина досліджуваної та стандартної проб, відповідно,

C_2 — концентрація стандартного розчину, у ммоль/л [12].

Усі експериментальні дослідження було розділено на три серії (Таблиця). У першій серії в якості дослідних проб використовували розчини N-ацГА з концентраціями 3.0 мМ, 5.0 мМ та 8.0 мМ. У другій визначали вміст

зв'язаних аміноцукрів окремо у сироватці крові здорових донорів та у тій самій сироватці, до якої безпосередньо перед гідролізом додавали 0.5 мл 3.0 мМ та 5.0 мМ розчинів N-ацГА. У третій серії аналогічно визначали загальний вміст аміноцукрів, тобто без відділення зв'язаної фракції. Всі визначення було проведено п'ятикратно та оброблено методами статистики з використанням критеріїв Стюдента [13].

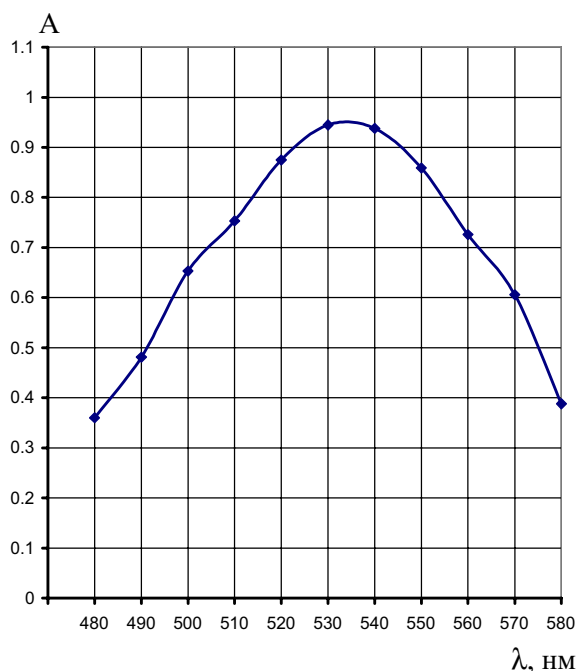
Результати та їх обговорення

На підготовчому етапі дослідження нами було визначено залежність оптичної густини від довжини хвилі, за якої вимірювали концентрацію розчину аміноцукру на спектрофотометрі СФ-46 (Рис. 1). Було визначено, що найбільші значення оптичної густини припадають на інтервал довжин хвиль 530-540 нм, що корелює з літературними даними [4, 6]. Тому для фотометричного визначення доцільно було застосувати фотоелектроколориметр (КФК-2МП) із зеленим світлофільтром ($\lambda = 540$ нм), який у користуванні значно простіший, ніж спектрофотометр.

Важливим моментом кількісного визначення є вибір оптимального часу, протягом якого має розвиватися вишнево-червоне забарвлення робочого розчину, що пов'язано зі зміною його інтенсивності під впливом багатьох чинників [8, 10]. Для цього було вивчено залежність оптичної густини досліджуваного розчину від часу (Рис. 2). Аналіз цих даних свідчить про те, що найбільш оптимальним інтервалом є 1 година, тому що після цього часу абсорбція має незначну динаміку змін. Слід відзначити, що до цього моменту значиме забарвлення, обумовлене інтерферуючими речовинами, такими як цукри та амінокислоти [8]. Таким чином, можна зробити висновок, що у процесі кількісного визначення дуже чітко необхідно дотримуватися часового інтервалу при розвитку забарвлення в усіх пробах.

На наступному етапі експерименту для визначення залежності оптичної густини від концентрації розчину глюкозаміну за допомогою стандартних розчинів було побудовано калібрувальну криву (Рис. 3). Звертає на себе увагу факт, що лінійна залежність зберігається в інтервалі до 0.6 ммоль/л, який і є найкращим для фотометричного визначення. Умови перебігу реакцій були підібрані таким чином, щоб прогнозована концентрація аміноцукру в робочому розчині знаходилася саме у цьому інтервалі, і в усіх випадках вона була в межах 0.14 - 0.51 ммоль/л.

Рисунок 1

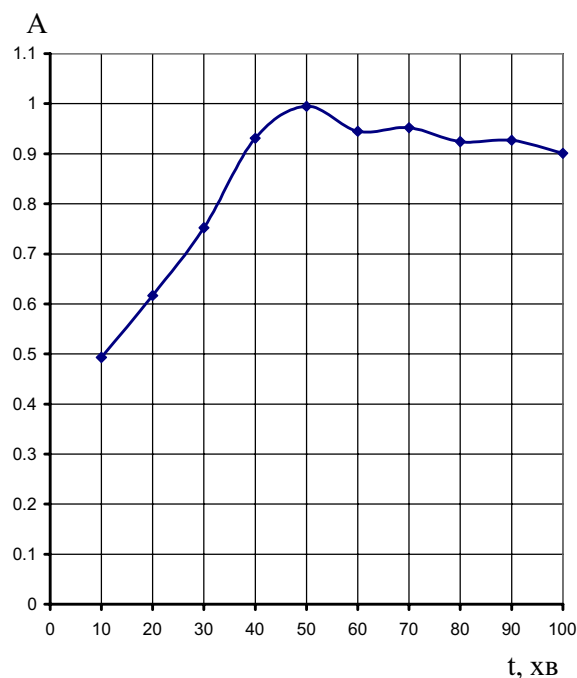


Залежність оптичної густини від довжини хвилі при визначенні глюкозаміну гідрохлориду у 0.5 мМ розчині

Після підбору оптимальних умов було проведено кількісне визначення N-ацГА у водних розчинах із відомою концентрацією та у сироватці крові за допомогою модифікацій досліджуваного методу, що дозволило їх зрівняти за такими показниками, як відсоток виявлення, що показує правильність та систематичну похибку визначення, і коефіцієнт варіації, який характеризує збіжність результатів методу. У II та III серіях використовували однакову сироватку крові здорових донорів, до якої додавали розчини N-ацГА відомої концентрації. Різниця між вмістом аміноцукру у сироватці з додаванням розчину та власне у сироватці крові має дорівнювати його номінальному вмісту у розчині за умов відсутності втрат [9]. Цю кількість гексозаміну співвідносили з реальним його вмістом у розчині відомої концентрації та підраховували у вигляді відсотка виявлення.

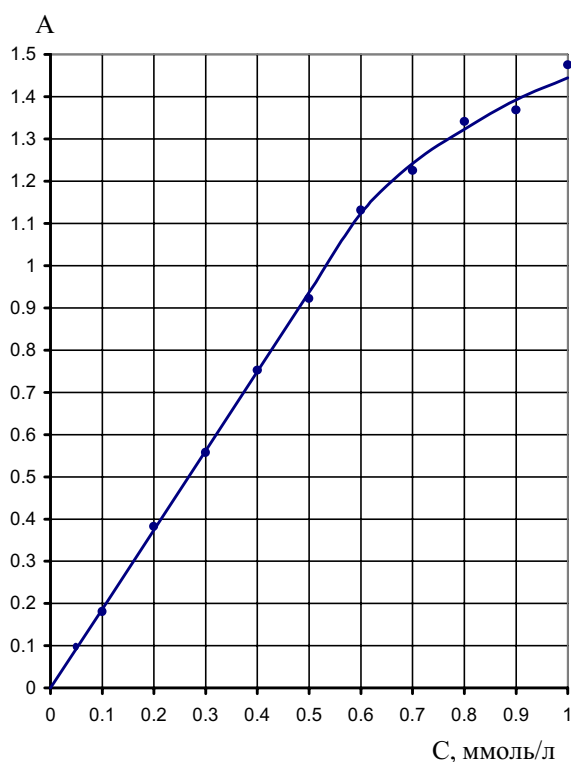
Результати дослідження наведено у Таблиці. Систематична похибка, а отже й частка втрат при визначенні N-ацГА за допомогою стандартних розчинів (II метод) значно менша, ніж при використанні калібрувальної кривої (I метод), а саме 1.5 - 6.4 % проти 6.9 - 10.8 %. Аналіз ступеня виявлення гексозаміну при використанні стандартів А та Б за методом II дозволяє зробити висновок, що чим ближче

Рисунок 2



Динаміка змінювання оптичної густини 0.5 мМ розчину глюкозаміну гідрохлориду у часі (λ=540 нм)

Рисунок 3



Залежність оптичної густини від концентрації розчину глюкозаміну гідрохлориду (λ = 540 нм)

Таблиця

Результати визначення N-ацетилглюкозаміну у водному розчині та у сироватці крові

Серія	Розчин N-ацГА, ммоль/л	Сироватка крові	Результат визначення					
			I метод		II метод			
			ммоль/л	%	А		Б	
ммоль/л	%	ммоль/л			%			
I	3.0	–	2.71 ± 0.07	90.2	2.85 ± 0.04	95.1	2.83 ± 0.06	94.2
	5.0	–	4.62 ± 0.1	92.3	4.90 ± 0.04	98.0	4.86 ± 0.08	97.1
	8.0	–	7.45 ± 0.13	93.1	7.56 ± 0.11	94.5	7.88 ± 0.09	98.5
II	–	+	4.57 ± 0.14	-	4.70 ± 0.12	-	4.52 ± 0.13	-
	3.0	+	7.25 ± 0.11	89.2	7.53 ± 0.09	94.3	7.45 ± 0.07	97.7
	5.0	+	9.17 ± 0.1	91.9	9.38 ± 0.11	93.6	9.28 ± 0.12	95.3
III	–	+	6.05 ± 0.13	-	6.16 ± 0.1	-	5.91 ± 0.14	-
	3.0	+	8.77 ± 0.09	90.5	8.98 ± 0.1	94.1	8.83 ± 0.15	97.2
	5.0	+	10.70 ± 0.15	93.0	10.84 ± 0.18	93.7	10.67 ± 0.15	95.2

концентрація стандарту до прогнозованого вмісту аміноцукру в біологічному матеріалі, тим вище правильність визначення. Так, у I серії ступінь виявлення при визначенні N-ацГА у 5.0 мМ розчині зі стандартом А та при визначенні у 8.0 мМ розчині зі стандартом Б сягає максимальних значень — 98.0 % та 98.5 %, відповідно. Результати II та III серій експерименту свідчать про те, що ступінь виявлення гексозаміну у сироватці крові з відділенням його зв'язаної фракції або без цього за допомогою методу II значно більший, ніж при застосуванні методу I. Особливо це помітно при використанні стандарту Б, бо його концентрація була ближче до номінального вмісту аміноцукру у сироватці крові та ступінь виявлення знаходився в межах 95.2 - 97.7 %. Також при використанні стандартних розчинів заслуговує уваги такий показник як коефіцієнт варіації, що протягом експерименту мав низькі значення та знаходився в інтервалі 1.1 - 1.8 %. Це характеризує збіжність результатів, а отже й внутрішньолaboratorну точність цього методу як досить високу для клініко-біохімічних лабораторних досліджень.

Висновки

1. При визначенні кількісного вмісту N-ацетилглюкозаміну у біологічному матеріалі загальновідомими модифікаціями методу Ельсона-Моргана відбувається заниження результатів, пов'язане з неминучим руйнуванням аміноцукрів переважно під час їх гідролітичного вивільнення. Частка втрат складає близько 9 - 10 %.

2. Застосування стандартних розчинів N-ацетилглюкозаміну, що проходили паралельно з досліджуваними пробами крізь усі стадії кількісного визначення, дозволило знач-

но знизити систематичну похибку та збільшити ступінь виявлення аміноцукру до 95 - 98 %.

3. Концентрація N-ацетилглюкозаміну у стандартному розчині має бути максимально наближеною до прогнозованого вмісту гексозаміну у біологічному матеріалі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Метод определения N-ацетилглюкозамина в биологическом материале / Зупанец І.А., Дрогозов С.М., Марван Мансур и др.: Информац. письмо. — Харьков: РПК «Фармація», 1996. — Вып. 3. — 4 с.
2. Зупанец І.А., Бездітко Н.В., Пропіснова В.В. Характер розподілу ендогенного N-ацетилглюкозаміну та екзогенного глюкозаміну гідрохлориду в органах і тканинах експериментальних тварин // Клінічна фармація. — 2002. — Т. 6, № 2. - С. 54-56.
3. Динаміка вмісту ендогенного N-ацетилглюкозаміну при запально-деструктивних процесах різної етіології та під впливом експериментальної терапії / Зупанец І.А., Попов С.Б., Шебеко С.К. та ін. // Клінічна фармація. — 2004. — Т. 8, № 4. — С. 34-37.
4. Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars / Ed. R.W. Jeanloz, E.A. Balazs. — New York; London: Acad. Press, 1969. — Vol. 1A. — 482 p.
5. Setnikar I. Pharmacokinetics of glucosamine in dog and man // *Arzneimittel. Forschung.* — 1986. — Vol. 36, No. 4. — P. 729-735.
6. Dressler F. Photometrische methode zur bestimmung von glucosamin und galactosamin aus den glycoproteinen des blutserums // *Z. Med. Lab. Diagn.* — 1985. — Vol. 26, No. 4. — P. 315-320.
7. Бычков С.М., Колесникова М.Ф. Определение глюкозамина и галактозамина в мукопротеидах и мукополисахаридах // *Биохимия.* — 1966. — Т. 31, № 3. — С. 533-540.
8. Stewart-Tull D.E. Determination of amino sugars in mixtures containing glucosamine, galactosamine and muramic acid // *Biochem. J.* — 1968. — Vol. 109. — P. 13-18.
9. Exley D. The determination of 10–100 mmg quantities of hexosamine // *Biochem. J.* — 1957. — Vol. 67. — P. 52-60.
10. Cessi C., Serafini-Cessi F. A method for the determination of d-galactosamine in the presence of d-glucosamine // *Biochem. J.* — 1963. — Vol. 88. — P. 132-136.
11. Weiden S. Hexosamine levels in health and disease // *J. Clin. Path.* — 1958. — Vol. 11 — P. 177-182.
12. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. — 2-е изд. — Минск: Интерпрессервис, 2003. — Т.1. — 495 с.

13. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2000. — 320 с.

Резюме

Зупанец І.А., Шебеко С.К.

Унифікація методів кількісного визначення ендogenous глюкозаміна в біологічному матеріалі

Рассмотрены возможности применения методов, основанных на реакции Эльсона-Моргана, для количественного определения эндогенного глюкозаміна в тканях и сыворотке крови. Определено, что подавляющее большинство этих методов имеет некоторые недостатки, основным из которых является занижение результатов из-за разрушения аминокислот в процессе количественного определения. Предложено параллельно с исследуемыми пробами использовать стандартный раствор N-ацетилглюкозаміна с концентрацией, близкой к его прогнозируемому содержанию в биологическом материале. Это позволило значительно снизить систематическую погрешность определения и улучшить степень выявления гексозаміна.

Summary

Zupanets I.A., Shebeko S.K.

Unification of methods of endogenous glucosamine assay in biological material

The opportunity of application of methods, based on Elson-Morgan reaction, for endogenous glucosamine assay in tissues and blood serum was considered. It was established that overwhelming majority of these methods has some defects, main of that was the understating of results because of amino sugars destruction during assay. At the same time and in the same manner with samples to be examined solution of N-acetylglucosamine with the concentration similar to its predicted content in a biological material was offered. It is allowed to decrease considerably a systematic error of determination and to improve a degree of hexosamine reveal.

Зупанец Ігор Альбертович. Д.мед.н. (1993). Професор (1994). Завідувач кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою НФаУ.

Шебеко Сергій Костянтинівич. Асистент кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою НФаУ.

Будова та властивості

УДК 615.31:547.856.1].076

Карпенко О.В., Сидорова І.В., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І., Портна О.О.
Запорізький державний медичний університет

Дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів та їх конденсованих аналогів

Проведено дослідження антиоксидантної (АОА) та антирадикальної (АРА) активності 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів та їх конденсованих аналогів методами неферментативного та ферментативного ініціювання вільнорадикального окиснення (ВРО) *in vitro*, а також за інгібуванням супероксид- та пероксинітрилрадикалу. Вивчено АОА досліджуваних сполук за окисної модифікації білка (ОМБ) в умовах ініціювання вільнорадикального окиснення *in vitro*. У результаті проведеного фармакологічного скринінгу знайдені речовини-лідери, що представляють значний інтерес для подальших досліджень на ряді модельних патологій, у механізмі розвитку яких провідна роль належить окисним реакціям.

4-(N-Ацил)гідразинохіназоліни та триазолохіназоліни представляють значний інтерес як біологічно активні речовини. Так, незважаючи на обмежену кількість робіт, присвячених дослідженню 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів, серед зазначених похідних виявлено сполуки з антиоксидантною та протиішемічною активністю [1, 2]. Заміщені триазолохіназоліни, які містять у своєму складі хіназоліновий біцикл, анельований із триазолом, — більш досліджений клас сполук, що пов'язано, насамперед, з їх фармакологічними властивостями. Так, у публікаціях останніх років показано, що зазначені сполуки селективно інгібують ліпідкіназу p110 delta [3], а також виявляють високій афінитет до аденозинових рецепторів [4-11]. До того ж, серед 2-(гет)арил-[1,2,4]триазо-

ло[1,5-с]хіназолін-5(6H)-онів виявлено перспективні анксиомодулятори, дія яких опосередкована впливом на бензодіазепінові рецептори [12, 13].

Синтез та дослідження антиоксидантної активності азотвмісних гетероциклів, що проводяться протягом останніх 15 років на кафедрах фармацевтичної хімії та фармакології ЗДМУ, дозволили встановити перспективність пошуку сполук із зазначеною дією серед похідних 4-гідразинохіназоліну [14-19]. У той же час, систематичного вивчення дії 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів і триазолохіназолінів на процеси вільнорадикального окиснення (ВРО) донині проведено не було.

Метою даною роботи є дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності 4-

Рисунок



а: R=CH₃, б: R=C₂H₅, в: R=C₃H₇, г: R=i-C₄H₉, д: R=CH₂-C₆H₅

Структурні формули досліджуваних сполук

(N-ацил)гідразинохіназолінів та їх конденсованих аналогів в умовах ініціювання ВРО *in vitro*.

Матеріали та методи

Для проведення біологічних випробувань використано 4-(N-ацил)гідразинохіназоліни (**1a-1d**), а також відповідні 2-алкілпохідні [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліну (**2a-2d**) (Рисунок), які синтезовано на кафедрі фармацевтичної хімії ЗДМУ (завідувач кафедри проф. Мазур І.А.) відомими методами [20].

Оцінку антиоксидантної активності (АОА) та антирадикальної активності (АРА) сполук у досліджах *in vitro* проводили на чотирьох моделях: при неферментативному та ферментативному ініціюванні ВРО, а також за інгібуванням супероксид- та пероксинітрилрадикалу [21].

Окисну модифікацію білка (ОМБ) проводили у гомогенаті мозку щурів лінії Вістар [16, 22]. До 0.25 г гомогенату тканини додають 7 мл 0.5 М фосфатного буферного розчину (температура розчину 5 °С) і центрифугують при 11000 г протягом 30 хв. До 0.1 мл підготовлено-

Таблиця 1
Антиоксидантна активність досліджуваних сполук

Сполука	Неферментативне ініціювання*		Ферментативне ініціювання *	
	концентрація малонового діальдегіду (МДА), ммоль/мл	АОА, %	концентрація малонового діальдегіду (МДА), ммоль/мл	АОА, %
інтакт	0.09 ± 0.01	–	0.50 ± 0.01	–
контроль	0.50 ± 0.00	–	1.84 ± 0.00	–
1a	0.40 ± 0.01**	20.0	1.60 ± 0.01**	13.0
1б	0.20 ± 0.02**	60.0	1.00 ± 0.01**	45.6
1в	0.35 ± 0.02**	30.0	1.55 ± 0.01**	15.8
1г	0.30 ± 0.01**	40.0	1.50 ± 0.01**	18.5
1д	0.38 ± 0.01**	24.0	1.55 ± 0.01**	15.8
2a	0.15 ± 0.01**	70.0	0.90 ± 0.01**	51.1
2б	0.18 ± 0.01**	64.0	1.00 ± 0.01**	45.6
2в	0.15 ± 0.01**	70.0	0.90 ± 0.01**	51.1
2г	0.30 ± 0.01**	40.0	1.40 ± 0.01**	23.9
2д	0.21 ± 0.01**	58.0	1.00 ± 0.01**	45.6
інтакт	0.25 ± 0.01	–	1.24 ± 0.011	–
контроль	4.92 ± 0.14	–	1.23 ± 0.04	–
дибунол	3.68 ± 0.05	25.2	–	–
α-токоферолу ацетат	4.12 ± 0.12	16.2	–	–
метіонін	–	–	1.03 ± 0.042	16.2
унітіол	–	–	1.00 ± 0.066	18.6

Примітки:

* — досліджувані сполуки вивчали в дозах: за ферментативного ініціювання ВРО — 0.38 мкмоль/мл; за неферментативного ініціювання ВРО — 1.5 мкмоль/мл; дибунол, α-токоферолу ацетат, метіонін, унітіол додавали в дозах 3.0 мкмоль/мл, 2.5 мкмоль/мл, 0.76 мкмоль/мл, 0.76 мкмоль/мл, відповідно;

** — достовірно по відношенню до контролю (p ≤ 0.05).

го гомогенату додають 0.1 мл досліджуваної речовини (10^{-6} М), 0.1 мл 2.8 % розчину заліза (II) сульфату, 0.1 мл 4 % розчину водню пероксиду та інкубують протягом 2 год. Потім додають 1 мл 25 % розчину кислоти трихлороцтової та центрифугують протягом 30 хв із частотою обертання 3000 об/хв. До 0.5 мл надосадової рідини додають 12.0 мл 0.9 % розчину натрію хлориду і вимірюють оптичну густину одержаного розчину за довжин хвиль 254 нм, 272 нм і 280 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 0.5 М фосфатний буферний розчин.

АОА (%) визначають за ступенем гальмування дефрагментації білка та обчислюють за формулою:

$$AOA = \frac{D_k - D_o}{D_k} \cdot 100\% ,$$

де:

D_k — оптична густина контрольного розчину;

D_o — оптична густина випробовуваного розчину.

До осаду, що залишився після центрифугування, додають 1 мл 2.2 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину (приготовленого на 7 % розчині кислоти хлористоводневої), інкубують протягом 1 год при температурі 37 °С, центрифугують протягом 10 хв із частотою обертан-

ня 3000 об/хв. Осад промивають 3 мл етилацетату, розчиняють у 3 мл 50 % розчину сечовини, додають 1 краплю 7 % розчину кислоти хлористоводневої та розводять водою очищеною 1:12. Визначають оптичну густину одержаного розчину за довжин хвиль 274 нм та 363 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 0.5 М фосфатний буферний розчин. АОА (%) визначали за гальмуванням утворення карбонільних (274 нм) і карбоксильних (363 нм) груп за вищенаведеною формулою. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Biostatistica».

Результати та їх обговорення

На моделі неферментативного ініціювання ВРО більшість із досліджуваних речовин виявляють виражену антиоксидантну дію, перевищуючи при цьому еталони порівняння (Табл. 1). При цьому, якщо для 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів (**1a-1d**) не спостерігалось чіткої залежності їх дії від характеру алкільного замісника, то для відповідних [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів (**2a-2d**) відмічалось загальне зростання активності у порівнянні з відповідними вихідними сполуками (**1a-1d**). Окремо слід відзначити, що рівень активності сполук **2a-2в** практично не залежить від довжини ал-

Таблиця 2

Антирадикальна активність досліджуваних сполук

Сполука	Інгібування супероксидрадикалу *		Інгібування пероксинітрилрадикалу	
	Оптична густина, D	АРА, %	Оптична густина, D	АРА, %
інтакт	—	—	0.15 ± 0.001	—
контроль	0.48 ± 0.00	—	0.30 ± 0.001	—
1a	0.48 ± 0.001	0	0.30 ± 0.001	0
1б	0.30 ± 0.001**	37.5	0.10 ± 0.00**	66.7
1в	0.40 ± 0.001**	16.7	0.30 ± 0.001	0
1г	0.45 ± 0.001**	6.25	0.27 ± 0.001**	10.0
1д	0.47 ± 0.001	2.08	0.30 ± 0.001	0
2a	0.36 ± 0.001**	33.3	0.23 ± 0.001**	23.3
2б	0.30 ± 0.001**	37.5	0.20 ± 0.001**	33.3
2в	0.27 ± 0.001**	43.7	0.10 ± 0.001**	66.7
2г	0.42 ± 0.001**	12.5	0.30 ± 0.001	0
2д	0.40 ± 0.001**	16.7	0.27 ± 0.001**	10.0
інтакт	—	—	0.15 ± 0.011	—
контроль	0.20 ± 0.002	—	0.30 ± 0.011	—
сечовина	0.131 ± 0.001	34.5	—	—
N-АЦЦ	—	—	0.15 ± 0.01	50.0

Примітки:

* — досліджувані сполуки вивчали в дозах: за інгібуванням супероксидрадикалу — 0.25 мкмоль/мл; за інгібуванням пероксинітрилрадикалу — 0.5 мкмоль/мл; сечовину та N-АЦЦ додавали в дозах 0.15 мкмоль/мл та 1.2 мкмоль/мл, відповідно;

** — достовірно по відношенню до контролю ($p \leq 0.05$).

кільного замісника і складає 64.0-70.0 %. У той же час розгалуження вуглеводневого ланцюга (**2г**), а також введення бензильного радикалу в молекулу (**2д**) призводять до зниження АОА.

Аналогічні закономірності спостерігаються і на моделі ферментативного ініціювання ВРО. Проте, у даному разі речовини **1а**, **1в**, **1д** виявилися менш активними, ніж еталонні сполуки. Виняток становить 4-(N-пропіоніл)гідразинохіназолін (**1б**), що перевищує дію метіоніну та унітіолу на 29.4 % та 27.0 %, відповідно. Цікаво зазначити, що всі триазолохіназоліни перевищували дію еталонів порівняння. При цьому 2-метил- та 2-пропіл-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліни (**2а** та **2в**) виявили найбільшу активність, що перевищує активність метіоніну та унітіолу майже у 3 рази (Табл. 1).

Дослідження АРА проводили на двох моделях ініціювання ВРО — за інгібуванням супероксид- і пероксинітритрадикалу (Табл. 2). На обох моделях АРА сполук **1а-1д** була нижчою у порівнянні з їх конденсованими аналогами **2а-2д**. Проте, сполука **1б** в обох випадках виявила найбільшу активність у порівнянні з іншими сполуками даного ряду. Так, за інгібуванням супероксидрадикалу 4-(N-пропіоніл)гідразинохіназолін (**1б**) достовірно перевищує дію сечовини на 3 %. Необхідно відзначити, що активність сполук на даній моделі послідовно

зменшується у ряду **1б**>**1в**>**1г**>**1д**, тобто подовження та розгалуження бічного вуглеводневого ланцюга призводить до зниження АРА.

Для триазолохіназолінів характерна інша залежність, яка полягає у підвищенні активності при подовженні вуглеводневого радикалу від сполуки **2а** до сполуки **2в**. Подальше розгалуження супроводжується зниженням активності.

За інгібуванням пероксинітритрадикалу дію еталонного N-АЦЦ на 16.7 % перевищили 4-(N-ацетил)гідразинохіназолін (**1б**) та 2-пропіл-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін (**2в**). Інші сполуки або незначним чином зменшували накопичення пероксинітриту (**2а**, **2б**), або виявилися взагалі неактивними (**1а**, **1в**, **1д**, **2г**).

Аналіз одержаних за спонтанною окисною модифікацією білка (ОМБ) даних показав, що у гомогенаті відмічається достовірно підвищення рівня продуктів ВРО (Табл. 3). Так, рівень карбонільних та карбоксильних груп — основних маркерів деструкції білкових молекул, що кількісно реагують із 2,4-динітрофенілгідрaziном (2,4-ДНФГ), був у 9 ($\lambda = 274$ нм) та 4 ($\lambda = 363$ нм) рази вищий за інтактне значення. Введення до гомогенату мозку щурів в умовах ОМБ синтезованих сполук призводить до достовірного зниження рівня карбонільних та карбоксильних груп. Так, значну активність в обох випадках виявили сполуки **1б**, **2а** та **2в**,

Таблиця 3

АОА досліджуваних сполук при ОМБ (пригнічення утворення карбонільних та карбоксильних груп) в умовах ініціювання ВРО

Сполука	Оптична густина ($\lambda=274$ нм)	АОА, %	Оптична густина ($\lambda=363$ нм)	АОА, %
інтакт	0.10 ± 0.001	—	0.20 ± 0.001	—
контроль	0.90 ± 0.001	—	0.80 ± 0.001	—
1а	0.80 ± 0.001*	11.1	0.80 ± 0.001	0
1б	0.50 ± 0.001*	44.4	0.40 ± 0.001*	50.0
1в	0.80 ± 0.001*	11.1	0.75 ± 0.001	6.25
1г	0.70 ± 0.001*	22.2	0.78 ± 0.001	2.5
1д	0.90 ± 0.001	0	0.80 ± 0.001	0
2а	0.45 ± 0.001*	50.0	0.40 ± 0.001*	50.0
2б	0.70 ± 0.001*	22.2	0.45 ± 0.001*	43.8
2в	0.45 ± 0.001*	50.0	0.35 ± 0.001*	56.3
2г	0.80 ± 0.001*	11.1	0.70 ± 0.001*	12.5
2д	0.80 ± 0.001*	11.1	0.75 ± 0.001	6.25
інтакт	0.35 ± 0.02	—	0.17 ± 0.001	—
контроль	1.3 ± 0.01	—	0.81 ± 0.02	—
емоксипін	0.85 ± 0.01*	34.6	0.75 ± 0.01*	7.4
ноофен	0.80 ± 0.02*	38.4	0.70 ± 0.02*	13.6
тіотриазолін	0.85 ± 0.01*	34.6	0.75 ± 0.01*	7.4

Примітка.

* — достовірно по відношенню до контролю ($p \leq 0.05$).

Таблиця 4

АОА досліджуваних сполук за ОМБ (ступінь дефрагментації білка в гомогенаті мозку щурів) в умовах ініціювання ВРО

Сполука	Оптична густина ($\lambda=254\text{nm}$)	АОА, %	Оптична густина ($\lambda=272\text{nm}$)	АОА, %	Оптична густина ($\lambda=280\text{nm}$)	АОА, %
інтакт	0.42 ± 0.001	–	0.09 ± 0.001	–	0.02 ± 0.001	–
контроль	1.60 ± 0.001	–	0.40 ± 0.001	–	0.28 ± 0.001	–
1a	1.60 ± 0.001	0	0.40 ± 0.001	0	0.27 ± 0.001	3.57
1б	$1.20 \pm 0.001^*$	25.0	$0.27 \pm 0.001^*$	32.5	$0.10 \pm 0.001^*$	64.3
1в	$1.40 \pm 0.001^*$	12.5	$0.32 \pm 0.001^*$	20.0	$0.23 \pm 0.001^*$	17.8
1г	1.60 ± 0.001	0	0.38 ± 0.001	5.00	$0.26 \pm 0.001^*$	7.14
1д	1.60 ± 0.001	0	0.40 ± 0.001	0	0.28 ± 0.001	0
2a	$1.50 \pm 0.001^*$	6.25	$0.37 \pm 0.001^*$	7.5	$0.20 \pm 0.001^*$	28.6
2б	$1.20 \pm 0.001^*$	25.0	$0.37 \pm 0.001^*$	7.5	$0.22 \pm 0.001^*$	21.4
2в	$1.00 \pm 0.001^*$	37.5	$0.25 \pm 0.001^*$	37.5	$0.09 \pm 0.001^*$	67.8
2г	$1.40 \pm 0.001^*$	12.5	$0.30 \pm 0.001^*$	25.0	$0.11 \pm 0.001^*$	60.7
2д	$1.50 \pm 0.001^*$	6.25	$0.36 \pm 0.001^*$	10.0	$0.18 \pm 0.001^*$	35.7
інтакт	0.054 ± 0.001	–	0.035 ± 0.001	–	0.03 ± 0.001	–
контроль	0.8 ± 0.02	–	0.75 ± 0.01	–	0.7 ± 0.01	–
емоксипін	0.8 ± 0.01	0	0.70 ± 0.01	6.67	0.65 ± 0.02	7.14
ноофен	0.8 ± 0.02	0	0.75 ± 0.01	0	0.7 ± 0.01	0
тіотриазолін	0.8 ± 0.02	0	0.75 ± 0.01	0	0.7 ± 0.01	0

Примітка.

* — достовірно по відношенню до контролю ($p \leq 0.05$).

перевищуючи за силою дії еталонні речовини. На зниження рівня пізніх маркерів ВРО (карбокисильних груп) впливала також і сполука **2б**, дія якої перевищувала ноофен більш ніж у 3 рази, а також сполука **2г**, достовірно перевищуючи емоксипін та тіотриазолін.

За ОМБ також відбувається значне підвищення рівня низькомолекулярних компонентів у порівнянні з інтактом, що вказує на інтенсифікацію дефрагментації білка в умовах ініціювання ВРО *in vitro*. Тому, крім впливу досліджуваних сполук на вміст карбонільних та карбокисильних груп, вивчалася їхня здатність запобігати дефрагментації білка в умовах ініціювання ОМБ. Аналіз результатів (Табл. 4) показав, що введення досліджуваних сполук викликає гальмування ОМБ. При цьому еталонні речовини, за винятком емоксипіну, не викликали зниження рівня низькомолекулярних компонентів. У ряду 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів найбільш активними виявилися сполуки із пропіонільним (**1б**) та бутаноїльним (**1в**) фрагментами. За всіх інших модифікацій молекули спостерігалася або значне зниження (**1г**), або повна втрата активності (**1a**, **1д**). Перехід до триазолохіназолінів супроводжується значним підвищенням активності у порівнянні з відповідними неконденсованими сполуками.

Отже, проведені дослідження показали, що синтезовані сполуки виявляють виражену АОА на моделях ініціювання ВРО *in vitro*, знижують рівень карбонільних та карбокисильних груп за ініціювання ОМБ, а також зменшують ступінь дефрагментації білка у гомогенаті мозку щурів, перевищуючи або конкуруючи за силою дії з еталонами порівняння. При цьому серед 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів за результатами біологічних випробувань найбільш активними виявився 4-(N-пропіоніл)гідразинохіназолін (**1б**), серед трициклічних похідних — речовини **2a**, **2б** та **2в**. На нашу думку, дія зазначених речовин пов'язана з їх здатністю „вловлювати” активні форми кисню (АФК) і вільні радикали як на ініціальних, так і на кінцевих етапах ВРО у досліджах *in vitro*, що підтверджено раніше проведеними дослідженнями [14, 15, 17-19, 23]. Наведені дані є експериментальним обґрунтуванням для більш поглиблених досліджень відібраних сполук на ряді модельних патологій, у механізмі розвитку яких провідна роль належить окисним реакціям.

Висновки

1. Проведені біологічні дослідження показали наявність вираженої антиоксидантної та антирадикальної активності 4-(N-ацил)гідразинохіназолінів та відповідних 2-алкіл-

[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів на різних моделях ініціювання ВРО.

2. Серед зазначених сполук знайдено речовини-лідери (**16**, **2a-2b**), що представляють значний інтерес для подальших досліджень на ряді модельних патологій, у механізмі розвитку яких провідна роль належить окисним реакціям.

ЛІТЕРАТУРА

1. А.с.1750172 СССР, МКИ⁴ С 07 Д 239/86, А 61 К 31/495. 4-(N-ацетил)гідразінохіназолін, проявляющий антиоксидантную и противоишемическую активность / Сияк Р.С., Коваленко С.И. и др. (СССР). - № 4876129/04; Заявлено 22.10.90. - (Не подлежит публ.).
2. Антиоксидантная активность нового производного 4-гідразінохіназолина при экспериментальной гипоксии головного мозга / Дунаев В.В., Беленічев И.Ф., Коваленко С.И. и др. // Украинский биохимический журнал. - 1993. - Т. 65, №3. - С. 118-120.
3. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities / Foukas L.C., Daniele N., Ktori C. et al. // J. Biol. Chem. - 2002. - Vol. 277, No. 40. - P. 37124-37130.
4. Modeling the Adenosine Receptors: Comparison of the Binding Domains of A_{2A} Agonists and Antagonists / Kim S.-K., Gao Z.-G., Rompaey P.V. et al. // J. Med. Chem. - 2003. - Vol. 46, No. 23. - P. 4847-4859.
5. A₃ Adenosine Receptors in Human Neutrophils and Promyelocytic HL60 Cells: A Pharmacological and Biochemical Study / Gessi S., Varani K., Merighi S. et al. // Mol. Pharmacol. - 2002. - Vol. 61, No. 2. - P.415-424.
6. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Investigation of New Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives as Human A₃ Adenosine Receptor Antagonists / Baraldi P.G., Cacciari B., Moro S. et al. // J. Med. Chem. - 2002. - Vol. 45, No. 4. - P. 770-780.
7. Neceptor Concept Based on Molecular Complementarity in GPCRs: A Mutant Adenosine A₃ Receptor with Selectively Enhanced Affinity for Amine-Modified Nucleosides / Jacobson K.A., Gao Z.-G., Chen A. et al. // J. Med. Chem. - 2001. - Vol. 44, No. 24. - P. 4125-4136.
8. [³H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A_{2B} adenosine receptors / Ji X.-d., Kim Y.-C., Ahern D.G. et al. // Biochem. Pharmacol. - 2001. - Vol. 61, No. 6. - P. 657-664.
9. Ohkubo S., Kimura J., Nakanishi H., Matsuoka I. Effects of P₁ and P₂ receptor antagonists on β,γ-methyleneATP- and CGS21680-induced cyclic AMP formation in NG108-15 cells // Br. J. Pharmacol. - 2000. - Vol. 129. - P. 291-298.
10. Adenosine induces cyclic-AMP formation and inhibits endothelin-1 production/secretion in guinea-pig tracheal epithelial cells through A_{2B} adenosine receptors / Pelletier S., Dube J., Villeneuve A. et al. // Br. J. Pharmacol. - 2000. - Vol. 129. - P. 243-250.
11. Derivatives of the Triazoloquinazoline Adenosine Antagonist (CGS 15943) Having High Potency at the Human A_{2B} and A₃ Receptor Subtypes / Kim Y.-C., Zwart M., Chang L. et al. // J. Med. Chem. - 1998. - Vol. 41, No. 15. - P. 2835-2845.
12. Benzodiazepine binding activity of some tricyclic heteroaromatic systems to define the hydrogen bonding strength of the proton donors of the receptor site / Colotta V., Catarzi D., Varano F. et al. // Farmaco. - 1996. - Vol. 51, No. 4. - P. 223-230.
13. Synthesis and Benzodiazepine Binding Activity of a Series of Novel [1,2,4]Triazolo[1,5-c]quinazoline-5(6H)-ones / Francis J.E., Cash W.D., Barbaz B.S. et al. // J. Med. Chem. - 1991. - Vol. 34, No. 1. - P. 281-290.
14. Нестерова Н.О. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 4-гідразінохіназоліну: Автореф. дис. ... к.фарм.н. - Київ, 2005. - 24 с.
15. Ноотропна активність похідних 4-гідразінохіназоліну при судомних та гіпоксичних ушкодженнях головного мозку / Сідорова І.В., Нестерова Н.О., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І. // Клінічна фармація. - 2005. - Т. 9, № 1. - С. 35-40.
16. Вплив похідних 4-гідразінохіназоліну на окисну модифікацію білка (ОМБ) в умовах ініціювання вільнорадикального окиснення *in vitro* / Сідорова І.В., Нестерова Н.О., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І. // Фармаком. - 2004. - № 4. - С. 68-73.
17. Патент на корисну модель 4706 Україна, А61Р9/00. N-(фенілаліден)-N'-хіназолін-4-іл-гідразин, що проявляє антиоксидантну, протиішемічну, протисудомну та антиамнестичну активність / Н.О. Нестерова, І.В. Сідорова, С.І. Коваленко та ін. (UA). - № 4706; Заявл. 03.12.2004; Опубл. 17.01.2005, Бюл. № 1.
18. Коррекція експериментальних порушень когнитивних функцій антиоксидантами производными 4-гідразінохіназолина / Сідорова І.В., Нестерова Н.А., Беленічев І.Ф. и др. // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2004. - № 3. - С. 113-115.
19. Дослідження антиоксидантної і церебропротективної активності деяких похідних 4-гідразінохіназоліну у дослідях *in vitro* та за умов модельних судом / Сідорова І.В., Нестерова Н.О., Беленічев І.Ф. та ін. // Експериментальна фізіологія та біохімія. - 2004. - № 3. - С. 44-51.
20. Карпенко О.В., Коваленко С.І. Синтез 2-R-триазоло[1,5-с]хіназолінів. Повідомлення 1 // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. - 2005. - Т. 3. - Выпуск 2 (10). - С. 47-54.
21. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідях *in vitro* / Губський Ю.І., Дунаев В.В., Беленічев І.Ф. та ін.: Методичні рекомендації. - Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. - 26 с.
22. Halliwell V. Free Radicals Biology Medicine. - Oxford Press, 1999. - 248 p.
23. Сідорова І.В., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І. Стратегія цілеспрямованого пошуку лікарських засобів церебропротективної дії // Вісник фармакології та фармації. - 2004. - № 9. - С. 22-25.

Резюме

Карпенко А.В., Сідорова І.В., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І., Портная Е.А.

Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности 4-(N-ацил)гідразінохіназолинов и их конденсированных аналогов

Проведено дослідження антиоксидантної (АОА) і антирадикальної (АРА) активності 4-(N-ацил)гідразінохіназолинов і їх конденсированих аналогів методами неферментативного і ферментативного ініціювання свободнорадикального окислення *in vitro*, а також по інгібуванню супероксид- і пероксинитритрадикала. Изучена АОА исследуемых соединений при окислительной модификации белка в условиях иницирования свободнорадикального окисления *in vitro*. В результате проведенного фармакологического скрининга найдены структуры-лидеры, которые представляют значительный интерес для последующих исследований на ряде модельных патологий, в механизме развития которых ведущая роль принадлежит окислительным реакциям.

Summary

Karpenko A.V., Sidorova I.V., Belenichev I.F., Kovalenko S.I., Portnaya E.A.

Study of antioxidant and antiradical activity of 4-(N-acyl)hydrazinoquinazolines and their condensed analogues

Study of antioxidant (AOA) and antiradical (ARA) activity of 4-(N-acyl)hydrazinoquinazolines and their condensed analogues by methods of nonfermentative and fermentative initiation of free radical oxidation *in vitro*, and also by inhibition of superoxide- and peroxi nitrite radical were conducted. AOA of test compounds at oxidizing modification of protein in conditions of free radical oxidation initiation was studied. At the result of conducted pharmacological screening structures – leaders, which represented significant interest for future studies on a number of model pathologies with oxidizing reactions on their mechanism were founded.

Карпенко Олександр Володимирович (н. 1980). Закінчив Запорізький державний медичний університет (2002), магістратуру при ЗДМУ (2003). Аспірант кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Сидорова Ірина Володимирівна. Закінчила Запорізький державний медичний університет (1997). Асистент (2001) кафедри фармакології і медичної рецептури ЗДМУ.

Беленічев Ігор Федорович (н. 1965). Закінчив Запорізький державний медичний університет (1988). Д.б.н. (2003). Завідувач кафедри фармакології і медичної рецептури ЗДМУ (2005).

Коваленко Сергій Іванович (н. 1962). Закінчив Запорізький державний медичний університет (1985). Д.фарм.н. (2002). Професор кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ (2002).

Портна Олена Олексіївна. Закінчила Запорізький державний медичний університет (1987). К.фарм.н. (1990). Доцент кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ (2005).

Проблеми. Пошук. Рішення.

УДК 615.4

Петрух Л.І.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Інноваційні продукти й оригінальний український препарат Флуренізид

Показано актуальність розробок ефективних ліків і механізмів трансферу інновацій у виробництво. Висвітлено деякі віхи 20-ти річної інноваційної діяльності автора у фармацевтичній галузі. Реалізовано одну із моделей «наука → технологія → виробництво → сфера споживання». На основі інноваційного продукту — оригінальної української субстанції Флуренізид створені перспективні лікарські засоби для різних галузей медицини.

Рушійною силою у досягненні добробуту суспільства та розбудови держави є постійна й багатогалузева інноваційна діяльність, організована на державному рівні. Спеціалісти високої кваліфікації, які володіють ґрунтовними знаннями, за допомогою новітніх технологій можуть забезпечити реальне і стабільне зростання національної економіки.

Розвиток науково-технічної та інноваційної діяльності є ключовим фактором економічного становлення і визначального пріоритету держави. Конкурентоспроможні галузі, що забезпечують науково-технічний прогрес визначені Законом України «Про пріоритетні напрями інноваційної діяльності в Україні» [1].

Закон України «Про інноваційну діяльність» [2] спрямований на підтримку розвитку економіки держави через впровадження інновацій, що істотно покращують структуру й якість виробництва або соціальної сфери. Набуває вагомого значення діяльність Української державної інноваційної компанії, а також Банку реконструкції та розвитку.

Як середньострокові пріоритетні напрями інноваційної діяльності у п.7, ст. 8 Закону [1] визначені, серед інших важливих, «охорона і оздоровлення людини та навколишнього середовища; лікарські засоби для лікування цукрового діабету, астми, серцево-судинних, онкологічних та інфекційних хвороб (СНІД, туберкульоз тощо); психотропні й наркотичні препарати; педіатричні форми лікарських засобів».

Інфраструктура ринку інновацій ґрунтується на комплексному аналізі результатів інтелектуальної праці, забезпеченні безперервного процесу впровадження нововведень і конкурентоспроможності продукції у серійне виробництво. Доцільність розвитку інноваційної інфраструктури та механізмів діяльності технологічного парку у фармацевтичній і хімічній галузях промисловості обумовлена, на нашу думку, великою потребою в українських ліках, у розширенні їх асортименту, отриманні конкурентних переваг на ринках держав світу.

Деякі проблеми вдається розв'язувати за допомогою технопарків: сприяти вузам та іншим науковим установам у передачі нових технологій в економіку; підтримувати на початковій стадії підприємців і навчати підприємництву у сфері науки та техніки у вузах, наукових центрах тощо; економічно відроджувати існуючі та створювати нові підприємства [3]. Економісти зазначають, що «технопарк не є організацією, яка приносить негайний прибуток. Надаючи пільги технопаркам, держава ставить перед ними задачу підтримувати високотехнологічні розробки, забезпечивши їх фінансування і просування на ринок. Акумуляція на спеціальних рахунках сум податку на додану вартість і податку на прибуток служить початком реінвестування й розширення кола учасників технопарку. Інноваційна політика технопарку передбачає вибір із множини ідей, технологій і наукових досягнень найпріоритетніші для їх комерціалізації й скерована на розвиток науково-технічного комплексу як унікальної динамічної системи з яскраво вираженими особливостями і здатної до адаптації у довкіллі» [4].

З економічного й соціального погляду фармацевтична промисловість є дуже важливою галуззю для української економіки.

Маркетингові дослідження показують, що лідерами світового фармацевтичного ринку є компанії, які виробляють інноваційні препарати. На світовому фармацевтичному ринку інноваційні препарати складають 50-60 %, на українському — близько 8 %. Встановлено, що доля вітчизняних готових лікарських засобів у загальній реєстрації протягом 2000-2005 років становить у середньому 39.45 % (у 2004 році — 38.11 %). Номенклатура продукції вітчизняних підприємств оновлюється за рахунок, в основному, генеричних лікарських засобів та препаратів у формі «in bulk» [5]. На фармацевтичному ринку України кількісно переважають генерики, які в різних лікарських формах імпортуються із 67 країн світу [6].

В Україні станом на 01.09.05 року є чинними 9818 реєстраційних посвідчень (РП) на зареєстровані/перереєстровані лікарські засоби. Серед них 3239 РП на зареєстровані/перереєстровані лікарські засоби вітчизняного виробництва; 6579 РП на зареєстровані/перереєстровані лікарські засоби іноземного виробництва [7]. Основу конкуренції серед українських виробників ліків становлять не пропозиції науковців про інноваційні чи модифіковані препарати, а ціна, асортимент і обсяги продаж конкурентів. Цим пояснюється висо-

кий ступінь дублювання препаратів широкого застосування виробниками і подальша тенденція до зниження цін у боротьбі за споживача [8].

Аналіз стану вітчизняної фармацевтичної промисловості показав, що для збереження внутрішнього фармацевтичного ринку, частка якого сьогодні становить 31 %, і створення в Україні ефективної системи забезпечення населення ліками потрібен перехід до інноваційного типу розвитку виробництва. Обґрунтовані основні складові інноваційної моделі фармацевтичного виробництва, визначені принципи й умови її побудови, критерії ефективного функціонування [9, 26, 27].

У державі наявний високий науково-практичний потенціал. У великих науково-дослідних інститутах (ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», Інститут органічної хімії НАН України, Фізико-хімічний інститут НАН України, Інститут молекулярної біології і генетики, Інститут фармакології і токсикології АМН України, ДП «Державний фармакологічний центр» МОЗ України й ін.) та у вищих навчальних закладах (перш за все у Національному фармацевтичному університеті) вчені працюють над реалізацією комплексних програм створення і дослідження вітчизняних лікарських засобів.

Відомі інновації українських вчених, що економічно вигідні для впровадження у виробництво. Використання наявного інтелектуального потенціалу, сучасних досягнень у створенні оригінальних субстанцій (синтетичного або природного походження), вітчизняних технологій готових лікарських форм сприятимуть розвитку економіки в усіх регіонах України. При загальній стратегії економічного розвитку в державі українські підприємства будуть спроможні виробляти нові конкурентоспроможні (або ж відомі) лікарські засоби, які гарантують споживачеві європейську якість і належний лікувальний ефект.

Орієнтація держави на інноваційний шлях розвитку економіки призведе до збільшення частки підприємств, що впроваджуватимуть якісні інновації на виробничих базах, створених відповідно до міжнародних вимог.

Задача полягає у розробці дієвих механізмів трансферу інноваційного продукту у виробництво, стратегічному плануванні та реалізації програм, спрямованих на вирішення актуальних проблем.

У законодавстві України передбачені заходи стимулювання юридичних осіб, що використовують об'єкти інтелектуальної власності.

Державна система стимулювання інноваційного розвитку ґрунтується на запровадженні механізмів прискореної амортизації та податкових стимулів інновацій, експорту високотехнологічної продукції, фінансуванні й кредитуванні інноваційної діяльності; формуванні ринкових джерел фінансування інновацій; ресурсному забезпеченні інноваційної сфери [2].

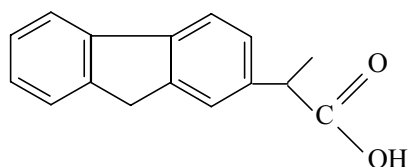
Для реалізації моделі «наука → технологія → виробництво → сфера споживання» необхідна активна співпраця науковців із відділами або структурами підприємств, зацікавлених освоювати інновації, і злагожена

координація дій між учасниками на кожній стадії інноваційного процесу.

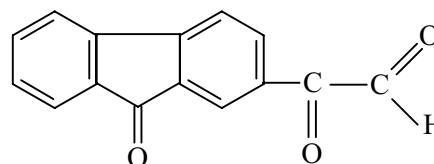
Метою даної роботи є висвітлення деяких віх 20-ти річної інноваційної діяльності автора на прикладі створення і впровадження у промислове виробництво нового українського препарату Флуренізиду протимікробної та імуномодуляційної дії.

Грунтовний аналіз автором патентної інформації вітчизняних і зарубіжних вчених (глибина досліджень 30-50 років у різних країнах світу) показав перспективність застосування флуоренів у медичній, ветеринарній, хімічній, фармацевтичній та ін. галузях науки,

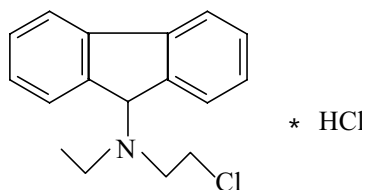
Рисунок



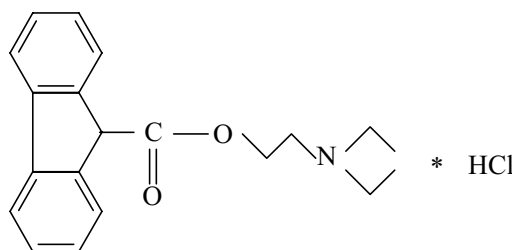
циклопрофен (протизапальний, знеболювальний засіб)



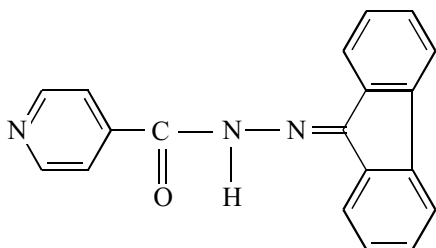
флуореналь (противірусний засіб)



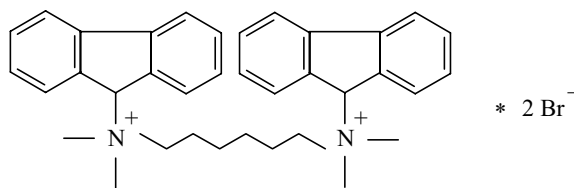
SKF 501 (симпатиколітичний засіб)



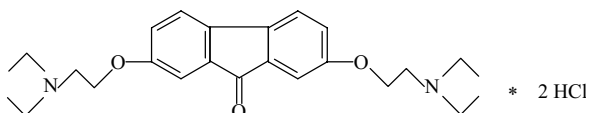
паватрин (спазмолітичний засіб)



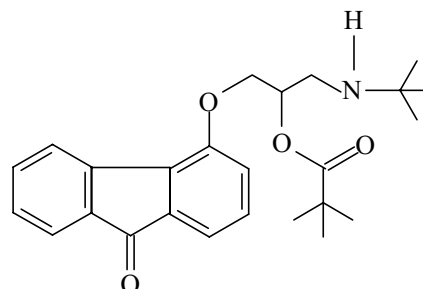
флуренізид (антимікробний засіб)



гексафлуоренбромід (м'язорелаксанти)



аміксин, тилорон (противірусний засіб)



LL 21-945 (адреноергічний блокатор β-рецепторів)

Структурні формули флуоренів

техніки й народного господарства. Описані речовини класу А61, що виявляють протимікробну, протипухлинну, інтерфероногенну та антивірусну (флореналь; тилорон, синонім аміксин), анальгезуючу (циклопрофен) і спазмолітичну (паватрин) дію. Структурні формули флуоренів як нового класу ліків подано на Рисунку.

Похідні флуорену запатентовані як речовини, які застосовують у рідких кристалах, як утворювачі пор для виготовлення заглибин і пористих виробів із пластмас; як хромогенні сполуки в матеріалі для носіїв запису, що застосовуються в системах оптичного розпізнавання знаків тощо. Деякі флуорени (класи С02, С03, С07, С09, G03) застосовують в органічному синтезі як сенсibiliзатори електрофотографічних шарів, фотоініціатори реакцій полімеризації, циклізації, фрагментації, перегрупування; антиозонатори натуральних і синтетичних дієнових каучуків. Серед флуоренів знайдені регулятори росту рослин (клас А01N), ефективні пестициди з антифунгіцидними і бактерицидними властивостями [10].

Вперше синтезовані автором нові флуорени виявили в досліджах *in vitro* та *in vivo* різносторонні біологічні ефекти, що значно перевищували активність відомих лікарських засобів, вибраних еталонами порівняння [11].

Дальші дослідження були спрямовані на процес перетворення низькомолекулярної хімічної сполуки в лікарський засіб за схемою: «біологічно активна речовина → фармакологічний засіб → лікарський препарат».

Вирішальне значення для досягнення мети мала творча співпраця автора з центральними лабораторіями Львівського заводу «Реактив». Розробка і впровадження у заводське виробництво промислових методик одержання нових біологічно активних речовин, забезпечених нормативно-технічною документацією, сприяла належному проведенню доклінічних досліджень, гарантії відтворення основної біологічної дії та стандартизації отриманих показників.

Суть науково-дослідної роботи: одержати інноваційні продукти і довести їх до промислового використання. Її здійснено за формулою «розробник → виробник → споживач».

На хімічні речовини флуоренового ряду за період 1983-1989 років розроблено 20 технічних умов і 19 лабораторних методик, які зареєстровані та внесені до Реєстру галузевої реєстрації. Визначено й запропоновано 10 перспективних нових флуоренів як потенційних субстанцій лікарських засобів. Для 5-ти

найперспективніших проведено фармакологічні дослідження за вимогами Державного Фармакологічного центру [10].

Подальші дослідження були зосереджені на фармакологічному засобі «Флуоренід» як інноваційному продукті, визначеному в результаті науково-дослідної роботи для впровадження у медичну й ветеринарну практику, у хімічну та фармацевтичну промисловість.

Широкомасштабне доклінічне і клінічне вивчення Флуореніду здійснено під керівництвом провідних вчених у вищих навчальних закладах і науково-дослідних інститутах Львова, Ростова-на-Дону, Москви, Санкт-Петербурга, Києва [10, 28].

Створення у 1992 році Фармакологічного комітету МОЗ України (м. Київ) та Фармакопейного комітету МОЗ України (м. Харків) дало можливість завершити доклінічні дослідження та контрольні клінічні випробування Флуореніду як українського препарату.

Важливо було здійснити всі стадії інноваційного процесу, розв'язати проблему матеріалізації наукового досягнення у виробництві з визначенням потенційної цінності об'єкта інтелектуальної власності та можливості його комерційної реалізації відповідно до законодавства України.

Творча активність автора була спрямована на співпрацю з виробником, на розвиток і використання інноваційного продукту у виробництві та соціальній сфері, оцінку його соціально-медичної та економічної ефективності, на здійснення нагляду за долею інноваційної пропозиції.

Удосконалено технологію промислового одержання субстанції флуореніду з метою забезпечення її конкурентної спроможності. Промисловий синтез субстанції флуореніду простий, хімічно коректний, практично безвідходний, екологічно чистий, вихідна сировина доступна.

У 2000 році Державне патентне відомство України зареєструвало ліцензійний договір на використання винаходу «Спосіб промислового одержання субстанції флуореніду».

У 2002 році отримано свідоцтво України на знак для товарів і послуг «флуоренід».

На виконання Указу Президента України від 11.05.2000 року № 679/2000 «Про невідкладні заходи щодо боротьби з туберкульозом», урахувавши наявність епідемії туберкульозу в Україні, необхідність одночасного застосування сучасних схем раціональної хіміотерапії цього захворювання на всій території країни, створення умов для припинення зрос-

тання захворюваності дітей та дорослих на туберкульоз і запобігання збільшенню числа випадків його хіміорезистентних форм, а також відповідно до постанови КМ України від 05.09.1996 року № 1071 (1071-96-п) «Про порядок закупівлі лікарських засобів закладами та установами охорони здоров'я, що фінансуються з бюджету», до Переліку лікарських засобів вітчизняного та іноземного виробництва, які необхідно придбати закладами і установами охорони здоров'я, що повністю або частково фінансуються з державного та місцевих бюджетів, затвердженого постановою КМ України від 5.09.1996 року № 1071 до фармакологічної групи «Протитуберкульозні препарати» (розділ 1 «Готові лікарські засоби») додано «флуренізид» [24, 25, 28].

Відповідно до Закону України «Про лікарські засоби» та постанови КМ України від 13.09.2000 року № 1422 «Про затвердження Порядку державної реєстрації (перереєстрації) лікарського засобу і розмірів збору за державну реєстрацію (перереєстрацію) лікарського засобу» зареєстровано та внесено до Державного реєстру лікарських засобів «флуренізид — порошок (субстанція), підприємство-виробник — ЗАТ «Київський вітамінний завод», країна — Україна, м. Київ» [28].

Відповідно до Порядку державної реєстрації (перереєстрації) лікарського засобу, затвердженого постановою КМ України від 27.04.1998 року № 569, лікарський засіб під назвою «флуренізид» зареєстрований в Україні у вигляді лікарської форми таблетки по 0.05 г, 0.15 г № 10 у контурних чарункових упаковках, № 1000 у баночках. Посвідчення видане ЗАТ «Київський вітамінний завод».

Відповідно до Порядку державної реєстрації (перереєстрації) лікарського засобу, затвердженого постановою КМ України від 13.09.2000 року № 1422, лікарський засіб під назвою «флуренізид» зареєстрований в Україні у вигляді лікарської форми супозиторії вагінальні по 0.1 г № 10 у контурних чарункових упаковках. Реєстраційне посвідчення видане ВАТ «Монфарм» (Черкаська обл, м. Монастирище).

На підставі постанови КМ України від 16.11.2001 року № 1482 «Про затвердження Національного переліку основних (життєво необхідних) лікарських засобів і виробів медичного призначення» флуренізид зачислено до групи лікарських засобів, що діють на мікобактерії, протитуберкульозні засоби (код згідно з міжнародною анатомо-терапевтично-хімічною класифікацією АТХ J 04A).

Флуренізид внесено до Реєстру галузевих нововведень [12, 28]. МОЗ України й Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ) видали дев'ять «Інформаційних листів про нововведення в системі охорони здоров'я» [13-21]. Якість Інформаційних листів гарантована власними дослідженнями авторів та експертною оцінкою проблемних комісій МОЗ України. Інформаційні листи є науковими документами, які містять обґрунтовані на засадах доказової медицини рекомендації п'яти наукових проблем МОЗ України («Фтизіатрія і пульмонологія», «Акушерство і гінекологія», «Дерматологія та венерологія», «Урологія та нефрологія», «Кардіологія і ревматологія») щодо способів, схем, лікарських форм і доз флуренізиду при застосуванні у хворих. Головні фахівці, які відповідають за політику впровадження наукових досягнень у регіонах, повинні оперативним чином інформувати практичних лікарів про нововведення в системі охорони здоров'я.

Інноваційний продукт перетворено на якісний, безпечний та ефективний лікарський засіб, що виявляє протитуберкульозну, антихламідійну та імуномодуляційну дію. Флуренізид ефективний при лікуванні різних форм туберкульозу у дорослих і дітей, приховано протікаючого силікотуберкульозу, уrogenітального хламідіозу, уреapлазмозу, мікоплазмозу, хронічного простатиту, піелонефриту, пілоричного гелікобактеріозу, системного та алергічного дерматозу, запалень шкіри та підшкірної клітковини, ускладнень після видалення злоякісних новоутворень шкіри, опіків і бактерійних запалень роги́вки [22, 23, 28].

У співпраці з науковцями і кваліфікованими фахівцями різних галузей медицини, фармації та ветеринарії розроблені такі лікарські засоби:

1. Флуренізид, субстанція для виготовлення лікарських форм (впроваджено у виробництво на ЗАТ «Київський вітамінний завод», 1999 рік).
2. Флуренізид, таблетки по 0.05 г і 0.15 г (впроваджено у виробництво на ЗАТ «Київський вітамінний завод», 2000 рік).
3. Флуренізид, капсули по 0.15 г і 0.3 г (впроваджено у виробництво на ЗАТ «Київський вітамінний завод», 2000 рік).
4. Супозиторії вагінальні з флуренізидом 0.1 г (впроваджено у виробництво на ВАТ «Монфарм», 2001 рік).
5. «Флумексид», суспензія (2 % флуренізиду на 30 % димексиді) (екстемпоральне виготовлення за магістральними формулами).

6. Очна флуоренідова мазь 1 % (екстемпоральне виготовлення за магістральними формулами).

7. Флуоренідова мазь 1 % і 5 % (екстемпоральне виготовлення за магістральними формулами).

8. Антисептичний засіб «Флупетсаль» (екстемпоральне виготовлення за магістральними формулами).

9. «Хламідид», супозиторії по 0,5 г (впроваджено на ВАТ «Ветпрепарати», Дніпропетровська обл., 1996 рік).

На нові препарати отримані патенти на винаходи України [11, 28].

Стратегія економічного та соціального розвитку до 2015 року, яка затверджена Указом Президента України у квітні 2005 року, ставить завдання забезпечити, починаючи від 2006 року, інноваційний прорив в економіці України. Визначальною є розбудова основних елементів національної інноваційної системи, а саме: продукування наукових знань та інновацій; їх комерціалізація та використання; формування інноваційної культури суспільства; інформаційне забезпечення та управління інноваційним розвитком. Фармацевтична галузь сприяє покращанню фізичного здоров'я української нації через наукові розробки, впровадження у виробництво і реалізацію лікарських засобів. Впровадження у виробництво можливе після доклінічної, фармакологічної та промислової апробації нової наукової розробки.

Висновки

Впровадження флуореніду у промислове виробництво на підприємствах України і в медичну практику сприяє реалізації державної програми розвитку економіки та підвищення якості життя громадян.

Зроблено достойний внесок у розвиток української фармацевтичної і медичної науки, у виробництво вітчизняних ефективних і безпечних ліків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Закон України «Про пріоритетні напрями інноваційної діяльності в Україні», 16 січня 2003. — № 433-IV.
2. Закон України «Про інноваційну діяльність», 4 липня 2002. — № 40-IV.
3. Мокій А.І. Аналітична записка. До рамкових проектних рішень щодо формування та реалізації інноваційної політики у м. Львові та Львівській області // Розробка стратегій розвитку інноваційної діяльності та підприємництва у Львівському регіоні. — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2003. — С. 106-110.
4. Макогон Ю.В., Медведкин Т.С. Подходи к формированию инновационных преимуществ экономики Украины // Развитие научно-технологических парков та инновационных структур інших типів: Україна і світовий досвід:

Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції (Львів, 23-26 червня 2003). — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2003. — С. 18-23.

5. Слободянюк М.М., Котляров Г.Б., Жадько С.В. Маркетингова товарна політика фармацевтичних підприємств // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: Матеріали VI Національного з'їзду фармацевтів України (28-30 вересня 2005 р., м. Харків) / Ред. кол.: В.П.Черних та ін. — Х.: Вид-во НФаУ, 2005. — С. 825-826.

6. Перехрест О. Асортимент лікарських засобів в Україні згідно з класифікаційною системою АТХ // Вісник фармакології та фармації. — 2003. — № 5. — С. 30-33.

7. Информационная справка о состоянии фармацевтического рынка Украины // Провизор. - 2005. — № 18. — С. 16-19.

8. Стефанов О., Бухтіарова Т., Чумак В., Перехрест О. Який асортимент ЛЗ внутрішнього фармринку України? // Вісник фармакології та фармації. — 2003. — № 3. — С. 2-12.

9. Посилкіна О.В. Управління інноваційно-інвестиційним розвитком фармацевтичного виробництва // Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок. — Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. — С. 480-482.

10. Маслова Л.И. Синтез и превращения производных флуорена, обладающих биологической активностью: Автореф. дис. ... д.фарм.н. - Харьков, 1990. — 39 с.

11. Петрух Л.І. Актуальність створення і впровадження у промислове виробництво нових лікарських засобів: Зб. описів винаходів / За ред. Петрух Л.І., Петрух В.М. — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2003. — 198 с.

12. Флуоренізд — новий оригінальний український препарат протитуберкульозної та протимікробної дії // Реєстр галузевих нововведень. - 2001. — Вип. № 14-15. — С. 87.

13. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 11-2001. «Флуоренізд — новий оригінальний український препарат протитуберкульозної та протимікробної дії». Укладачі: акад. АМН України Ю.І. Феценко, проф. В.М. Борис, проф. Л.М. Литвин, проф. І.Г. Ільницький, проф. Л.І. Петрух, О.П. Костик, О.А. Ткач, В.О. Панасюк, К.Д. Мажак, Н.Р. Гречуха. Установа-розробник: Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького, Львівський НДІ епідеміології та гігієни // Фтизіатрія і пульмонологія. - Київ, 2001. — Вип. № 2.

14. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 106-2001. «Застосування флуореніду у комплексній терапії хворих на екзему». Укладачі: Б.Т. Глухенький, Я.М. Туркевич, О.Ю. Туркевич, О.О. Сизон; Установа-розробник: Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького, КМАПО ім. Шупика // Дерматологія та венерологія. - Київ, 2001. — Вип. № 4.

15. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 214-2002. «Застосування препарату «флуоренізд» в комплексній терапії хворих на сифіліс». Укладачі: Г.М. Якубович, Р.В. Лабінський, проф. Л.І. Петрух. Установа-розробник: Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Дерматологія та венерологія. - Київ, 2002. — Вип. № 6.

16. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 227-2002. «Лікування хламідійної інфекції у хворих на хронічний пієлонефрит за допомогою препарату «флуоренізд». Укладачі: проф. М.І. Швед, проф. Л.І. Петрух, О.В. Гевко. Установа-розробник: Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачовського МОЗ України, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Урологія та нефрологія. - Київ, 2003. — Вип. № 8.

17. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 176-2003. «Методика застосування супозиторіїв вагінальних з флуоренізидом». Укладачі: проф. Л.І. Петрух, проф. А.Ю. Франчук, О.В. Пронюк, А.В. Бойчук, Т.І. Кулініч; Установа-розробник: Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Акушерство і гінекологія. - Київ, 2003. — Вип. № 9.
18. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 235-2003. «Спосіб застосування флуоренізиду у вигляді супозиторіїв вагінальних в акушерстві та гінекології». Укладачі: А.В. Бойчук, Т.І. Кулініч, проф. Л.І. Петрух, О.В. Пронюк, проф. А.Ю. Франчук; Установа-розробник: Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачовського МОЗ України, Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Акушерство і гінекологія. - Київ, 2003. — Вип. № 12.
19. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 243-2003. «Спосіб застосування препарату «флуоренізид» в комплексній терапії псоріазу». Укладачі: проф. О.В. Буянова, проф. Л.І. Петрух, С.М. Гринюк; Установа-розробник: Івано-Франківська державна медична академія МОЗ України, Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Дерматологія та венерологія. - Київ, 2003. — Вип. № 9.
20. Інформаційний лист. «Рифабутин і флуоренізид в хіміотерапії хворих деструктивним туберкульозом легень». Укладачі: д.мед.н., проф. Й.Б. Бялик, к.мед.н. Л.М. Циганкова, к.мед.н. Ж.Е. В'ялих, Н.А. Литвиненко // Фтизіатрія і пульмонологія. — Київ, 2004.
21. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я: № 17-2005. «Спосіб лікування хворих на реактивні хламідій-асоційовані артрити». Укладачі: Р.К. Журасв, О.О. Абрагамович, Л.І. Петрух; Установа-розробник: Львівський державний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Укрмедпатентінформ МОЗ України // Кардіологія і ревматологія. - Київ, 2005. — Вип. № 1.
22. Сабко В. Впровадження нового вітчизняного препарату флуоренізид у практику охорони здоров'я України // Ваше здоров'я. - 16-22 серпня 2002. — № 31. — С. 11.
23. Сучасні підходи до оцінки якості наукової продукції у медичній галузі: Матеріали наук.-практ. конференції (Київ, травень 2003 р.) — К., 2003. — 126 с.
24. Наказ МОЗ України № 154 від 07.07.2000 року «Про зміни до Переліку, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 05.09.96, № 1071».
25. Наказ МОЗ України № 120 від 15.05.1998 року «Про державну реєстрацію лікарських засобів».
26. Петрух Л.І. Вклад у розвиток науково-технологічного парку створення і виробництва нових українських ліків // Розвиток науково-технологічних парків та інно-

ваційних структур інших типів: Україна і світовий досвід: Матеріали II Міжнародної науково-практ. конф. (Львів, 23-26 червня 2003). — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2003. — С. 49-55.

27. Петрух Л.І. Впровадження оригінальних ліків — пріоритетний напрям державної політики // Розвиток науково-технологічних парків та інноваційних структур інших типів: Україна, Польща і світовий досвід. Виставка спільних українсько-польських науково-технічних проєктів: Матеріали III Міжнародної науково-практ. конф. і виставки (Львів, 21-22 червня 2004). — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2004. — С. 65-68.

28. Петрух Л.І. Вклад у розвиток української фармацевтичної та медичної науки й практики кафедри фармацевтичної хімії факультету післядипломної освіти ЛНМУ імені Данила Галицького. Історичний нарис. До 50-річчя факультету післядипломної освіти ЛНМУ імені Данила Галицького / За ред. д.фарм.н., проф. Петрух Л.І. — Львів, ЛьВЦНТЕІ, 2005. — 156 с.

Резюме

Петрух Л.І.

Инновационные продукты и оригинальный украинский препарат Флуоренизид

Показана актуальность разработок эффективных лекарственных препаратов и механизмов трансфера инноваций в производство. Освещены некоторые вехи 20-ти летней инновационной деятельности автора в фармацевтической отрасли. Реализирована одна из моделей «наука → технология → производство → сфера применения». На основании инновационного продукта — оригинальной украинской субстанции Флуоренизид созданы перспективные лекарственные средства для различных отраслей медицины.

Summary

Petrukh L.I.

Innovation products and original Ukrainian preparation Flurenizid

The urgency of development of effective drugs and the mechanism of a transfer of innovations in manufacture was shown. Some milestones of author 20 years innovative activity in pharmaceutical industry were illustrated. One of models «science → technology → manufacture → sphere of consumption» was realized. On basis of innovation product - original Ukrainian substance Flurenizid, perspective preparations for different branches of medicine were created.

Петрух Любов Іванівна. Працює у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького (від 1966). Д.фарм.н. (1990). Професор (1993). Зав. кафедри фармацевтичної хімії факультету післядипломної освіти (від 1991).

Готові лікарські засоби

УДК. 615.453

Загорий В.А., Стромко С.Б., Перемот З.П., Буцкая В.Е.

Киевская медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика

Закрытое акционерное общество «Фармацевтическая фирма «Дарница»

Научно-экспериментальное обоснование изменения состава препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, в связи с введением в действие Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины

Показано, что при применении высокоэффективных связывающих веществ можно получить препарат «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, отвечающий требованиям Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины по истираемости.

С введением в действие Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины 1-го издания (ГФУ 1.1) и изменением требований к истираемости таблеток без оболочки, необходимо переработать нормативно-техническую документацию на многие таблетированные препараты [1, 2]. В связи с невозможностью использования прибора для определения истираемости таблеток, описанного в ГФ XI [3], целый ряд твердых лекарственных средств не соответствует современным фармакопейным требованиям по этому показателю.

Целью настоящей работы является оптимизация составов и технологий таблетированных лекарственных препаратов, давно выпускаемых ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница», для приведения их качества в соответствие с требованиями ГФУ по истираемости.

Старая номенклатура (десятилетней и более давности) занимает значительное место в производстве твердых лекарственных форм на ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница».

Основным вспомогательным веществом при разработке таблетлируемых лекарственных форм являлся крахмал картофельный как мультифункциональный наполнитель. Большая часть выпускаемых таблетированных лекарственных форм по истираемости соответствует требованиям ГФ XI, где описан используемый прибор и приведено нормирование (до 3 %). Однако, крахмал картофельный, как основное вспомогательное вещество в составе целого ряда таблеток, не может прогнозировано гарантировать истираемость в пределах 1 % при испытаниях на приборе, указанном в Европейской Фармакопее [4].

В данной ситуации требуется дополнительная фармразработка уже давно известных, хорошо себя зарекомендовавших, дешевых и

ставших «народными» препаратов. Одним из таких препаратов является «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г.

Производство данного лекарственного средства в течение всего времени выпуска проводилось по технологии влажной грануляции. В состав препарата входили следующие вспомогательные вещества: крахмал картофельный (8.84 %), кальция стеарат или кислота стеариновая (0.25 %). В качестве увлажнителя - связывающего вещества использовался крахмальный клейстер 10 %.

Выяснилось, что серийные образцы препарата не соответствуют требованиям по истираемости на приборе, описанном в [1] (образование сколов и крошек), из-за недостаточной прочности поверхности таблеток.

При перерегистрации препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, в 2005 году перед нами встала задача оптимизировать его состав путем введения новых высокоэффективных связывающих веществ, чтобы добиться соответствия новым требованиям ГФУ. При этом важным было сохранение биодоступности препарата и его стоимости.

Работа была проведена на базе исследовательской лаборатории и цеха твердых и мягких лекарственных средств «ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница».

С целью разработки оптимального состава и рациональной технологии производства препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, были проведены следующие исследования:

1. изучение физико-химических и технологических свойств субстанции — хлорамфеникола;

2. научно-экспериментальное обоснование оптимального состава препарата и стадий технологического процесса, обеспечивающих необходимые технологические параметры в

процессе прессования и соответствие таблеток требованиям ГФУ;

3. исследование показателей качества полученных таблеток в соответствии с проектом АНД.

Для экспериментальной работы использовались приборы и методики, описанные в [5, 6].

Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции

Для дополнительной фармразработки использовалась субстанция хлорамфеникола производства фирмы «Northeast General Pharmaceutical Factory», Китай. Основные физико-химические и технологические характеристики субстанции (средние значения из трех определений), представлены в Табл. 1.

Данные Табл. 1 свидетельствуют о плохой текучести субстанции, обусловленной анизодиаметрическим строением частиц порошка хлорамфеникола. Большая дозировка действующего вещества в лекарственной форме (0.5 г) и плохая текучесть, обеспечивающая равновес при таблетировании, невысокий показатель прессуемости порошка предопределили, в данном случае, применение метода влажной грануляции.

Научно-экспериментальное обоснование оптимального состава препарата и стадий технологического процесса, обеспечивающих необходимые технологические параметры в процессе прессования и соответствие таблеток требованиям ГФУ

Состав вспомогательных веществ и рациональная технология получения таблеток подбирались с учетом оптимального соотношения в массе для таблетирования действующих и вспомогательных веществ, обеспечивающего необходимые технологические режимы для получения таблеток.

Для получения препарата на основе данной субстанции необходимо применить технологию влажной грануляции с раствором высокоэффективного связывающего вещества. В качестве таковых испытывались поливинилпир-

ролидон (ПВП) и эфиры целлюлозы (МЦ, ГПЦ, ГПМЦ).

Раствор поливинилпирролидона низкомолекулярного (М.м. 12000) испытывался в концентрации 10-20 % [7], растворы эфиров целлюлозы — в концентрации 3-10 %. Гранулят опудривался кальция стеаратом в количестве 1 % [8]. Форма и размер таблеток оставлены без изменения. Была установлена зависимость распадаемости, истираемости и устойчивости к раздавливанию полученных таблеток от вида и концентрации используемого увлажнителя.

Результаты проведенных исследований представлены в Табл. 2.

Как видно из Табл. 2, при использовании водных растворов поливинилпирролидона в концентрации 10 %, 15 % и 20 % и растворов эфиров целлюлозы в концентрации 3 %, 5 % и 10 %, устойчивость к раздавливанию полученных таблеток возрастала в зависимости от концентрации увлажнителя и была практически одинаковой для 20 % раствора ПВП, 10 % раствора ГПЦ и 10 % раствора ГПМЦ. Раствор МЦ в концентрации 5 % обеспечивал устойчивость к раздавливанию вдвое меньше. Однако распадаемость таблеток, содержащих массу для таблетирования на основе ГПЦ и ГПМЦ, была несколько лучшей, чем при использовании ПВП. Кроме того, при увеличении давления у таблеток с ПВП появлялось расслаивание. Поэтому наиболее целесообразным в данном случае является использование в качестве гранулирующего агента 10 % раствора ГПМЦ.

Наличие многочисленных сколов на таблетках после проведения теста на истираемость свидетельствовало о необходимости введения в состав массы для таблетирования вспомогательных веществ, улучшающих устойчивость таблеток к раздавливанию. С этой целью была выбрана микрокристаллическая целлюлоза марки М102, как вещество, оптимальное с точки зрения соотношения цена : «строительные» возможности. Ее применение показано в качестве связывающего вещества в

Таблица 1

Физико-химические и технологические свойства субстанции хлорамфеникола

Нормируемый показатель	Значение показателя
влажностное содержание, %	0.62
насыпная плотность, m/V ₁₂₅₀ , г/мл	0.571
угол естественного откоса, град.	43 ± 1.0
текучесть, с/100 г образца	500 ± 1
прессуемость, Н	30
гранулометрический состав, %	более 90 % от 40 мкм до 100 мкм

составах для прямого прессования [8], но МКЦ марки М102 также с успехом применяется и в производстве препаратов по технологии влажной грануляции. В качестве дезинтегранта была выбрана натрия кроскармеллоза - вещество оптимальное с точки зрения соотношения цена : возможности дезинтеграции.

Экспериментальным путем были подобраны вспомогательные вещества, которые обеспечивали бы соответствие препарата требованиям ГФУ.

Масса таблетки в процессе фармразработки изменилась с 0.55 г до 0.60 г. Но это не повлекло за собой изменения типоразмера пресс-инструмента. Таблеточная масса выбранного состава и полученная по оптимизированной технологии имеет следующие технологические характеристики: влагосодержание 1.22 %; насыпная плотность 0.448 г/мл; текучесть 8.43 с/100 г; гранулометрический состав: более 60 % от 200 мкм до 500 мкм, менее 40 % от 50 мкм до 200 мкм; внешний вид - таблеточная масса белого с желтоватым оттенком цвета; количественное содержание — 0.503 г в навеске 0.600 г. Коэффициент Карра равен 22 %, что свидетельствует о хорошей прессуемости таблеточной массы [9].

Таблетирование полученной массы проводили на прессе Kilian, тип S-250 в комплекте с обеспыливателем Kramer C810. После установления соответствующей средней массы таблетки производили поиск оптимального основного давления прессования в интервале (8-50) кН, при установочной производительности пресса 30 тыс.табл./ч. Признаков расслаивания таблеток даже при таблетировании на предельном давлении не наблюдалось. При величине основного давления 30 кН на пуансон, что соответствует удельному давлению 265.39 Н/мм², был получен оптимальный результат по устойчивости к раздавливанию и распадемости таблеток. Далее производился поиск оптимальной производительности пресса в интервале (30-180) тыс.табл./ч. При увеличении производительности пресса до более 150 тыс.табл./ч отклонение таблеток от сред-

ней массы наблюдалось на величину более 2.5 % (требование ГФУ — не более 5 %). Это связано с тем, что текучесть массы недостаточна для проведения процесса таблетирования при большой производительности пресса, и заполняемость матричного пространства не является постоянной величиной. Хотя отклонение от средней массы таблеток соответствовало требованиям ГФУ, этот показатель являлся достаточно большим, поэтому увеличение производительности пресса до более 150 тыс.табл./ч не является целесообразным.

Исследование показателей качества полученных таблеток в соответствии с проектом АНД

Показатели качества препарата с оптимизированными составом и технологией:

- внешний вид - таблетки с плоской поверхностью, фаской и риской, белого с желтоватым оттенком цвета;
- средняя масса — 0.603 г,
- однородность массы — отклонение от средней массы не превышает $\pm 5\%$,
- высота таблетки — 3.85 мм,
- диаметр таблетки — 12.0 мм,
- устойчивость к раздавливанию - не менее 110.5 Н,
- истираемость — 0.12 %,
- распадемость — 7 мин.

Наработанные в достаточном количестве в цеховых условиях образцы препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0,5 г, заложены в архив для изучения стабильности и возможности увеличения сроков хранения.

Изменения в составе и технологии производства препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, не повлекли за собой изменений методик количественного и качественного контроля. Выполнение анализа ГЛС проводилось по обновленному проекту АНД.

Результаты анализа образцов препарата по проекту АНД:

- внешний вид - таблетки с плоской поверхностью, фаской и риской, белого с желто-

Таблица 2

Физико-механические характеристики таблеток левомецетина в зависимости от вида и концентрации увлажнителя

Показатель	Название и концентрация используемого водного увлажнителя таблеток											
	ПВП, %			МЦ, %			ГПЦ, %			ГПМЦ, %		
	10	15	20	3	5	10	3	5	10	3	5	10
устойчивость к раздавливанию, Н	50	90	110	30	45	45	80	90	100	70	90	120
распадаемость, мин	3	5	24	4	15	20	1	2	3	9	13	20
истираемость, %	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы	сколы

- ватым оттенком цвета. По внешнему виду таблетки соответствуют требованиям ГФУ.
- подлинность — препарат соответствует требованиям,
- посторонние примеси — препарат соответствует требованиям,
- средняя масса — 0.601 г,
- количественное содержание хлорамфеникола в одной таблетке — 0.5032 г,
- количество хлорамфеникола, перешедшего в среду растворения через 45 мин, составляет 100.6 % от указанного разделе «Состав на одну таблетку»,
- распадаемость — не более 7 мин,
- истираемость — 0.12 %,
- микробиологическая чистота — препарат соответствует требованиям.

Наработанные образцы препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0,5 г, предлагаемого состава прошли аналитический контроль. Результаты анализа препарата с оптимизированным составом вспомогательных веществ соответствуют требованиям аналитических тестов, указанных в проекте АНД и близки к показателям аналитических тестов для препарата существующего состава.

При внесении изменений в состав вспомогательных веществ было подобрано их оптимальное соотношение с учётом положительного влияния на физико-механические свойства таблеточных масс и таблеток, изучена стабильность препарата при хранении и определена неизменность его биофармацевтической доступности в сравнении с существующим составом (в опытах *in vitro*).

Согласно полученным экспериментальным данным, кинетика высвобождения хлорамфеникола из препарата с новым составом соот-

ветствует кинетике высвобождения действующего вещества из референтного препарата.

В настоящее время препарата «Левомецетин-Дарница», таблетки по 0.5 г, с оптимизированным составом проходит изучение стабильности. Затем в установленном законом порядке он будет передан на процедуру перерегистрации, после завершения которой данное лекарственное средство будет готовиться к серийному производству.

Выводы

Проведенные исследования показали возможность перевода номенклатуры давно производимых, широко применяемых, ставших «народными» препаратов на новые требования ГФУ по истираемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. - С. 73-74.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 160-161.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. - С. 96-98.
4. European Pharmacopoeia. — 4th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
5. Белоусов В. А., Вальтер М.Б. Основы дозирования и таблетирования лекарственных порошков. - М., 1980. - С. 11-48, 175-211.
6. Таблеточные машины в медицинской промышленности / Под ред. Кольман-Иванова Э.Э. - М., 1975. - С. 7-68.
7. Коллидон. Поливинилпирролидон для фармацевтической промышленности. - Фолькер Бюлер, 2001. - С. 191-214.
8. Промышленная технология лекарств / Под ред. проф. Чуешова. - Харьков, 1999. - С. 212-222.
9. Carr R. Evaluating flow properties of solids // Chemical Engineering. - 1965. — No. 18. — P. 163-168.

Резюме

Загорій В.А., Стромко С.Б., Перемот З.П., Буцька В.Є.

Науково-експериментальне обґрунтування зміни складу препарату «Левомецетин-Дарниця», таблетки по 0.5 г, у зв'язку із запровадженням Доповнення 1 до Державної Фармакопеї України

Показано, що при застосуванні високоефективних зв'язувальних речовин можна одержати препарат «Левомецетин-Дарниця», таблетки по 0.5 г, що відповідає вимогам Доповнення 1 до Державної Фармакопеї України зі стираності.

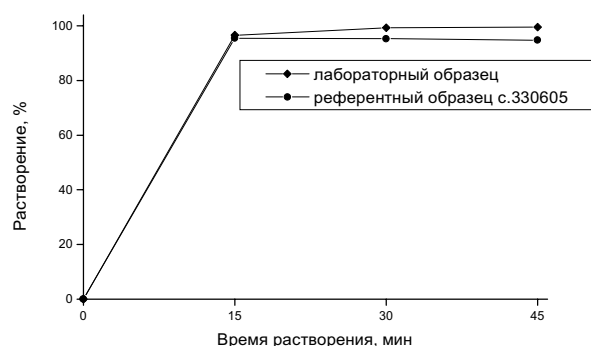
Summary

Zagoriy V.A., Stromko S.B., Peremot Z.P., Butskaya V.E.

Scientific-experimental basis of change of composition of Levomycetin – Darnitsa, tablets on 0.5 g, in connection with publication of the Supplement 1 to the State Pharmacopoeia of Ukraine

It was shown, that at application of highly effective adhesion agents, it is possible to receive Levomycetin - Darnitsa, tablets on 0,5 g, which would meet the requirements on friability.

Рисунок



Кинетика высвобождения хлорамфеникола из препарата «Левомецетин-Дарниця», таблетки по 0.5 г, со старым и оптимизированным составом

Загорий Владимир Антонович (р. 1951). Окончил Ленинградский химико-фармацевтический институт. Зав. кафедрой промышленной фармации Киевской медицинской академии последипломного образования им. П.Л. Шупика. Д.фарм.н. Профессор. Генеральный директор ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница».

Стромко Сергей Борисович (р. 1975). Окончил Национальную фармацевтическую академию Украины (1992). Работает на ЗАО «ФФ «Дарница» (с 2004). Ведущий инженер-технолог исследовательской лаборатории.

Перемот Зоя Павловна. Окончила Киевский технический институт пищевой промышленности (1978), Национальную фармацевтическую академию Украины (2001). Работает на ЗАО «ФФ «Дарница» (с 1984).

Буцкая Виктория Евгениевна. Окончила Вицебский фармацевтический институт (1987). Доцент кафедры промышленной фармации Киевской медицинской академии последипломного образования им. П.Л. Шупика. К.фарм.наук.

УДК 615.457+615.23]:615.324

Сиденко Л.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Исследования по выбору вспомогательных веществ для создания стабильных глазных/назальных капель на основе экстракта биологически активных веществ животного происхождения

Приведены результаты исследований по выбору вспомогательных веществ для разработки глазных/назальных капель на основе экстракта биологически активных веществ вилочковой железы.

В последние годы широкое распространение получила биорегулирующая терапия, как одно из перспективных направлений в клинической офтальмологической и ринологической медицине. Многолетний опыт использования пептидных биорегуляторов в офтальмологии и ринологии показал высокую эффективность данного класса веществ при различных заболеваниях и патологических состояниях, особенно при диабетической ретинопатии, различных дистрофических процессах сетчатки, а также заболеваниях полости носа и околоносовых пазух. Комплексность и избирательность действия пептидных препаратов на морфофункциональные структуры глаза - роговицу, сосуды, сетчатку и зрительный нерв позволяют осуществлять системный подход к консервативному лечению этих заболеваний [1].

В офтальмологической и ринологической практике биорегуляторы животного происхождения, в основном, используются в форме инъекций для внутримышечного или подкожного применения.

Препараты в форме глазных/назальных капель на основе комплекса биологически активных веществ животного происхождения до настоящего времени отсутствуют, что можно объяснить трудностью получения стабильных водных растворов с необходимым сроком хранения не только в герметичной упаковке,

но и после ее вскрытия. Потребность в такой лекарственной форме определяется необходимостью восстановления иммунологических показателей при хронических заболеваниях глаза и носа, а также при хронических соматических заболеваниях, вследствие которых возникают нарушения в этих органах.

Целью настоящей работы являлась разработка научно обоснованного состава оригинального препарата в форме капель иммуномодулирующего и антиаллергического действия на основе экстракта биологически активных веществ (БАВ) вилочковой железы с использованием различных вспомогательных веществ, а также изучение его химической, микробиологической стабильности и биологической активности.

Объекты и методы

Объектом исследования являлся экстракт биологически активных веществ вилочковой железы крупного рогатого скота, производства ЗАО «Трудовой коллектив Киевского предприятия по производству бактериальных препаратов «Биофарма». В качестве активных компонентов экстракта выступают соединения нуклеотидной и нуклеозидной природы, олигопептиды, аминокислоты, амины, неорганические соли. Стандартизация состава капель проводилась по количественному содержанию в одном контейнере: пептидов — от

10 мг до 22 мг; суммы нуклеозидов и нуклеотидов — не менее 0.2 мг.

При разработке состава глазных/назальных капель использовали вспомогательные вещества отечественного и импортного производства, исходя из их физико-химических свойств и соответствия требованиям НТД (Табл. 1).

Оценку результатов испытаний при выборе вспомогательных веществ проводили на основе качественного, количественного, микробиологического и биологического методов анализа наработанных образцов препарата совместно с лабораториями физико-химических процессов, микробиологии, иммунологии и аллергологии ГП ГНЦАС.

Качественный контроль осуществляли визуально просмотром образцов препарата для оценки прозрачности и цветности растворов (отсутствие взвеси, опалесценции, осадка или нерастворимых частиц), отсутствие механических включений в соответствии с [2]. Контроль pH растворов проводили потенциометрически в соответствии с [3]. Количественный анализ наработанных образцов осуществляли методами абсорбционной спектрофотометрии, аргентометрического титрования, ВЭЖХ [3]. Биологическую активность определяли методом количественного определения *in vitro* T₃ (общих) лимфоцитов в реакции розеткообразования (Е-РОК). Эффективность антимикробных консервантов проверяли в соответствии с методикой, описанной в [3]. Результаты микробиологических исследований и биологической активности будут представлены в следующих работах.

Результаты и их обсуждение

Для решения поставленной задачи в соответствии с [4, 5] исследовали химическую и микробиологическую совместимость экстракта БАВ вилочковой железы с веществами различной химической природы и различного назначения, обеспечивающими необходимые параметры лекарственной формы (pH, осмолярность, срок хранения после вскрытия, показатель преломления, поверхностное натяжение, биодоступность): буферными растворами, консервантами, вязкообразующими компонентами.

Для достижения максимального терапевтического эффекта препарата и обеспечения его стабильности большое значение имеет pH раствора. Область стабильности БАВ, входящих в состав препарата, обеспечивается при pH от 5.5 до 7.0. Эти значения могут быть достигнуты применением буферных растворов. Наиболее часто применяемыми и физиологически приемлемыми для глаза и слизистой носа являются ацетатный, боратный и фосфатный буферные растворы. Ацетатный буферный раствор для данного препарата не пригоден, поскольку его максимальная буферная емкость находится в кислой области pH, в которой не сохраняется стабильность препарата. Нами использовались фосфатный [6] и боратный буферные растворы [7].

Для изучения химической совместимости экстракта с компонентами буферных растворов были наработаны различные модельные растворы с критическими интервалами pH, полученные добавлением рассчитанных количеств ингредиентов. Результаты исследований представлены в Табл. 2.

Таблица 1

Вспомогательные вещества, используемые при разработке состава препарата

Наименование вспомогательного вещества	НТД
натрия дигидрофосфат дигидрат	ГФУ 1 изд.
динатрия фосфат додекагидрат	ГФУ 1 изд.
кислота борная	ГФУ 1 изд.
натрия тетраборат	ГФУ 1 изд.
бензалкония хлорид	ЕР 5 изд.
декаметоксин	ФС 42У-46-152-97
хлоргексидина биглюконат	ВФС 42-1401-84
хлорбутанол	Дополнение 1 к ГФУ 1 изд.
метилпарагидроксибензоат	ГФУ 1 изд.
пропилпарагидроксибензоат	ГФУ 1 изд.
тиомерсал	ВР, 2001
поливинилпирролидон	ЕР 5 изд.
декстран-70	ЕР 5 изд.
гидроксипропилметилцеллюлоза	ЕР 5 изд.

Из Табл. 2 видно, что оба буферных раствора совместимы с экстрактом вилочковой железы. Учитывая, что фосфатный буферный раствор наиболее приемлем для естественной среды глаза, так как слезная жидкость уже содержит фосфаты, для дальнейших исследований выбран именно этот буферный раствор.

Одним из показателей качества, предъявляемых к офтальмологическим и назальным препаратам, является микробиологическая чистота, которая достигается применением консервантов - веществ, обладающих высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов.

В ходе работы были исследованы следующие консерванты:

- четвертичные аммониевые соединения (бензалкония хлорид (0.005-0.01 %), декаметоксин (0.01 %));
- галогенизированные спирты (хлорбутанол (0.5 %));
- бигуаниды (хлоргексидина биглюконат (0.005-0.01 %));
- эфиры пара-оксибензойной кислоты (метилпарагидроксибензоат (0.1-0.2 %), пропилпарагидроксибензоат (0.02-0.05 %)) и их сочетание;
- органические соединения ртути (тиомерсал (0.001-0.02 %)).

Как видно, круг этих веществ довольно ограничен. Сложности же при создании препаратов на основе БАВ животного происхожде-

ния состоят не только в сохранении их стабильности в процессе хранения, но и в обеспечении микробиологической чистоты лекарственной формы при ее длительном использовании. Это непростая задача, так как не только вспомогательные, а и действующие вещества экстракта вилочковой железы не должны влиять на активность консерванта, т. е. не являться его инактиваторами. С другой стороны, консервант и вспомогательные вещества не должны влиять на активность действующих веществ.

Результаты проведенных исследований по химической совместимости веществ представлены в Табл. 3.

Из имеющегося перечня консервантов бензалкония хлорид (БАХ) - наиболее часто применяемый в офтальмологии и ринологии. Он обладает широким спектром действия в интервале рН среды от 4.0 до 8.0. Но четвертичные аммониевые соединения часто несовместимы с экстрактами животного происхождения, что и наблюдалось при добавлении бензалкония хлорида к экстракту вилочковой железы: образовывалась взвесь, в дальнейшем переходящая в осадок. Это может объясняться возможностью взаимодействия бензалкония хлорида (смеси гомологов от C_8 до C_{18}) с присутствующими в растворе пептидами, в результате чего также падает антимикробная активность консерванта.

Таблица 2

Зависимость показателей качества раствора экстракта БАВ вилочковой железы с буферными растворами от рН среды

Буферный раствор	рН исследуемого раствора	Прозрачность раствора	Цветность раствора	Количественное содержание пептидов в одном контейнере, мг	Суммарное количественное содержание нуклеотидов и нуклеозидов в одном контейнере, мг
фосфатный	5.5	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.6	0.22
	6.0	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.8	0.24
	6.5	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	15.0	0.21
	7.0	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.2	0.26
боратный	5.5	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	15.2	0.23
	6.0	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	15.0	0.26
	6.5	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	16.2	0.28
	7.0	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.4	0.24

Декаметоксин, относящийся к классу четвертичных аммониевых соединений, в отличие от БАХ, является индивидуальным синтетическим веществом. Но в процессе исследований было установлено, что при его добавлении в раствор экстракта БАВ вилочковой железы с различной степенью очистки получают растворы с различной степенью мутности. Представляло интерес проверить взаимодействие декаметоксина и пептидов с различными значениями молекулярной массы (от низкомолекулярных до высокомолекулярных). В результате экспериментов установлено, что все растворы по степени мутности соответствовали эталонам № 2 - 4 [3], что не соответствует качеству глазных капель по прозрачности.

Хлоргексидина биглюконат наибольшую противомикробную активность проявляет в области рН среды выше 6.0. С экстрактом БАВ вилочковой железы данный консервант является несовместимым.

Хлорбутанол химически совместим с экстрактом БАВ вилочковой железы. Однако оптимальное значение рН среды для хлорбутанола находится в интервале от 2.0 до 5.0, что не соответствует интервалу рН, обеспечивающего стабильность препарата.

Тиомерсал максимальную эффективность антимикробного действия проявляет в интервале рН среды 3.0-8.0. Нарботанные нами образцы лекарственного препарата, включающие тиомерсал, по внешнему виду и количе-

ственному содержанию стандартизируемых веществ соответствовали требованиям, предъявляемым к глазной/назальной лекарственной форме. Однако при выборе консерванта, содержащего соединения ртути, необходимо обратить внимание на два немаловажных фактора:

1. известно, что 8-10 % населения имеют повышенную чувствительность к тиомерсалу. Это может быть обусловлено широким использованием этого соединения в качестве консерванта в косметических средствах и вакцинах [8]. Тиомерсал вызывает классический дерматоконъюнктивит с иммунной реакцией клеточного типа [9];

2. в процессе производства, в соответствии с санитарно-гигиеническими нормами, необходим жесткий контроль содержания тиомерсала в сточных водах.

Представителями класса парабенов являются метилпарагидроксибензоат и пропилпарагидроксибензоат. Наибольшая эффективность их антимикробного действия наблюдается при рН среды 2.0 – 8.0. Эти вещества обладают малой токсичностью. В процессе исследований установлено, что экстракт БАВ вилочковой железы крупного рогатого скота химически совместим с данными веществами.

Таким образом, проведенные исследования показали, что экстракт БАВ совместим с галогенизированным спиртом (хлорбутанол), эфирами пара-оксибензойной кислоты (метилпа-

Таблица 3.

Показатели качества свежеприготовленных растворов экстракта БАВ вилочковой железы с консервантами

Консервант	Прозрачность раствора	Цветность раствора (не интенсивнее эталона У ₃)	Количественное содержание пептидов в одном контейнере, мг	Суммарное количественное содержание нуклеотидов и нуклеозидов в одном контейнере, мг	Количественное содержание консерванта в растворе, г/мл
бензалкония хлорид	взвесь	-	9.0	0.12	0.00005
декаметоксин	взвесь	-	8.5	0.13	0.00008
хлорбутанол	прозрачный	+	14.0	0.21	0.0048
хлоргексидина биглюконат	взвесь	-	8.5	0.12	0.00003
метилпарагидроксибензоат	прозрачный	+	15.0	0.25	0.001
пропилпарагидроксибензоат	прозрачный	+	16.0	0.22	0.00005
тиомерсал	прозрачный	+	14.6	0.23	0.00002

Примечания:

+ — соответствует требованиям;
 — — не соответствует требованиям.

рагидроксibenзоат, пропилапарагидроксibenзоат), органическим соединением ртути (тиомерсал).

Наряду с буферными агентами в препарат введены различные высокомолекулярные соединения (ВМС), также позволяющие улучшить стабильность препарата и способствовать пролонгации его действия. С этой целью нами использованы следующие ВМС: поливинилпирролидон, декстран-70, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ).

Поливинилпирролидон обеспечивает увеличение биодоступности, уменьшает раздражение глаза и слизистой носа, вызванное активными веществами; оказывает пролонгированное действие; выполняет роль формообразователя (при создании лиофилизированной формы). Декстран улучшает не только стабильность, но и проницаемость через капиллярные стенки. Применяемая в качестве пролонгатора ГПМЦ позволяет получить растворы с оптимальной вязкостью, что способствует более длительному удерживанию препарата на поверхности глаза и слизистой носа. Результаты исследований по химической совместимости экстракта вилочковой железы с ВМС представлены в Табл. 4.

В результате проведенных исследований установлено, что все ВМС химически совместимы с экстрактом БАВ вилочковой железы.

Выводы

В результате проведенных исследований выбраны оптимальные количества вспомогательных веществ, позволившие обеспечить необходимые показатели качества разрабатываемых глазных/назальных капель: прозрачность, цветность, рН, количественное содержание БАВ экстракта и консервантов, осмолярность, биологическую активность. Нарботанные образцы лекарственного препарата заложены на хранение для проведения следующего этапа фармацевтической разработки - испытания стабильности.

Таблица 4

Показатели качества растворов экстракта БАВ вилочковой железы и ВМС

Высокомолекулярное соединение	Прозрачность раствора	Цветность раствора	Количественное содержание пептидов в одном контейнере, мг	Суммарное количественное содержание нуклеотидов и нуклеозидов в одном контейнере, мг
поливинилпирролидон	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.8	0.24
декстран-70	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.6	0.22
гидроксипропилметилцеллюлоза	прозрачный	не интенсивнее эталона Y_3	14.2	0.25

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. Пептидные биорегуляторы в офтальмологии. - Спб.: ИКФ «Фолиант», 2000. - 48 с.
2. РД 64-076-89. Инструкция. Контроль лекарственных средств в виде глазных капель на отсутствие в них механических включений. - М.: Министерство медицинской и микробиологической промышленности СССР, 1989. - 7 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.
4. Руководство 42-3.2:2004. Руководство по качеству. Лекарственные средства. Фармацевтическая разработка. - К.: Министерство здравоохранения Украины, 2004. - 18 с.
5. Руководство 42-3.6:2004. Руководство по качеству. Лекарственные средства. Вспомогательные вещества. - К.: Министерство здравоохранения Украины, 2004. - 11 с.
6. United States Pharmacopeia. - XXVII ed. - Rockville, 2004.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. - М.: «Химия», 1989. - С. 267 - 273.
8. Микробиологический аспект применения контактных линз / Сергиенко Н.М., Ковальчук В.П., Рыков С.А., Палий И.Г. // Офтальмологический журнал. - 1993. - № 2. - С. 112-115.
9. Mendino B.J. Allergic and toxic reactions in soft contact lens wearers // Surv. Ophthalmol. - 1982. - Vol. 26. - P. 105.

Резюме

Сиденко Л.М.

Дослідження з вибору допоміжних речовин для створення стабільних очних/назальних крапель на основі екстракту біологічно активних речовин тваринного походження

Наведено результати досліджень із вибору допоміжних речовин для розробки очних/назальних крапель на основі екстракту біологічно активних речовин вилочкової залози.

Summary

Sidenko L.N.

Studies at the choice of excipients for the creation of stable eye/nasal drops at the basis of extract of biologically active substances of animal origin

Results of the study at the choice of excipients for the development of eye/nasal drops at the basis of biologically active substances of thymus were given.

Сигенко Лариса Николаевна. Окончила УкрФА (1998). Мл. науч. сотр. лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦЛС.

Стандартизація лікарських засобів

УДК 615.457.07

Андрюкова Л.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Объем выборки и нормы содержания частиц в глазных каплях при контроле их качества по показателю «Механические включения»

В зависимости от совокупности различных факторов: разнообразия типов контейнеров (многодозовые, однодозовые, цельные, сборные) для глазных капель, материалов, из которых они изготовлены (пластмассы, стекло), лекарственных форм (водные растворы и порошки для приготовления капель), а также фактора первичности введения новых методов контроля обоснованы подходы к установлению видов контроля, объемов выборки и норм контроля глазных капель при анализе их качества на содержание механических включений. Результаты положены в основу разработанного проекта нового документа по контролю глазных капель по показателю «Механические включения».

В настоящее время фармацевтические предприятия Украины производство глазных капель осуществляют в контейнерах, изготовленных из материалов, характеризующихся различной прозрачностью [1, 2]. Это не всегда позволяет проводить 100 % визуальный контроль продукции на содержание механических включений, предусмотренный действующим в настоящее время документом РД 64-076-89 [3]. Для решения этой проблемы в ГП ГНЦЛС разработан проект нового нормативного документа по контролю качества глазных капель по показателю «Механические включения».

Поиск информационных материалов, являющийся одним из этапов исследований, проведенных при разработке нового документа, позволил выделить актуальные для данной проблемы вопросы и наметить пути их решения [4]. Изучались следующие вопросы: требования к содержанию видимых и невидимых частиц в глазных каплях, методы и техника проведения контроля, объем выборки при выборочном контроле, нормирование содержания механических включений. Полученные результаты показали, что ведущие Фармакопеи [5-9], за исключением Фармакопеи США (USP), для глазных капель содержат требования контроля только на наличие видимых частиц. Контроль глазных капель на содержание невидимых частиц впервые введен USP 27 [10]. В настоящее время основным методом контроля является визуальный метод. В зависимости от прозрачности материала контейнеров для глазных капель осуществляют либо 100 % визуальный неразрушающий контроль, либо выборочный визуальный разрушающий контроль. Информация по вопросам стандартизации норм выборки при проведении выборочного контроля и нормирования содержания механических частиц в глазных каплях в

литературе отсутствует. Подробно результаты информационного поиска по рассматриваемой проблеме изложены в [4].

Целью данной работы является обоснование объема выборки и норм содержания механических частиц при контроле глазных капель.

Вне зависимости от материала, из которого изготовлены контейнеры, предлагается, как и в [3], *двукратный* (первичный и вторичный) визуальный контроль глазных капель по показателю «Механические включения». Это обосновано, с одной стороны, тем, что, несмотря на большие трудности организационного характера и расходы на контроль для двукратного контроля по сравнению с однократным, уменьшается риск брака продукции как для изготовителя, так и для потребителя. С другой стороны, введение новых видов контроля всегда требует наработки определенного опыта с целью получения достоверных результатов. Для глазных капель *в стеклянных контейнерах* предложен первичный 100 % визуальный контроль, вторичный — выборочный визуальный неразрушающий контроль. Для *глазных капель в контейнерах из пластмассовых материалов и для порошков для приготовления глазных капель в стеклянных контейнерах* предлагается первичный и вторичный выборочный визуальный разрушающий контроль.

При получении предприятиями сертификата GMP на производство глазных капель установление объема выборки и оценку результатов первичного и вторичного контроля предлагается проводить как для вторичного контроля.

Для обоснования объема выборки при выборочном контроле глазных капель выбраны *2 подгруппы*.

1. Согласно действующему в настоящее время РД 64-076-89, объем выборки образцов глазных капель для вторичного выборочного визуального контроля составляет 1 % от размера серии, но не менее 50 контейнеров. Размеры серий данной лекарственной формы (ЛФ) в контейнерах вместимостью 1 мл, 5 мл и 10 мл с учетом мощности современных производств глазных капель в Украине могут составлять 10-100 тыс. штук. Соответственно, размер выборки составит 100-1000 контейнеров. Для неразрушающего вторичного выборочного контроля количество препарата 50-200 штук является приемлемым с точки зрения длительности контроля. Разрушающий же контроль такого количества образцов может привести к большому расходу времени на контроль и затратам материальных ценностей. С точки зрения материальных затрат также не выгодно оставлять на арбитражное хранение в архиве такое количество образцов от каждой серии.

Для первичного внутрицехового выборочного разрушающего контроля объем выборки предлагаем определять в соответствии с общими правилами отбора проб (выборок) лекарственных средств, приведенными в статье «Отбор проб» ГФ XI [11], требования которой действуют до настоящего времени. Согласно [11] проводят многоступенчатый отбор выборок, при котором выборку образуют по ступеням и продукцию в каждой ступени отбирают случайным образом в пропорциональных количествах из единиц, отобранных в предыдущей ступени.

Число ступеней определяется видом упаковки:

I ступень: отбор единиц упаковочной тары (ящичков, коробок, мешков и др.);

II ступень: отбор упаковочных единиц, находящихся в упаковочной таре (коробок, флаконов, банок и др.);

III ступень: отбор продукции в первичной упаковке (ампул, флаконов, туб и др.).

Для расчета отбора количества продукции на каждой ступени используют формулу:

$$0.4 \cdot \sqrt{n},$$

где:

n — количество упаковочных единиц данной ступени одной серии.

Полученное в результате подсчета по формуле дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30.

Предлагаем объем выборки для первичного внутрицехового выборочного разрушающего контроля, который призван доказать со-

ответствие полученной продукции необходимому качеству, независимо от размера серии установить в количестве 30 контейнеров. Это количество является приемлемым как с точки зрения материальных затрат, так и длительности проведения анализа. Учитывая требования к качеству глазных капель по показателю «Механические включения» в странах ближнего зарубежья (коэффициент дефектности (K_{Δ}) = 1.5), результаты контроля образцов препаратов, предоставленных предприятиями-изготовителями, результаты по количеству брака продукции по исследуемому показателю на предприятиях, а также результаты проведенного нами сравнительного анализа понятий K_{Δ} [3] и константы качества ($K_{\text{кач.}}$) [12], считаем целесообразным K_{Δ} продукции при первичном внутрицеховом выборочном разрушающем контроле принять равным 1.5. Остановимся более подробно на результатах проведенного нами сравнительного анализа понятий коэффициента дефектности и константы качества.

Коэффициент дефектности согласно [3] является среднеарифметическим числом обнаруженных *ворсинок* из взятых на контроль единиц продукции. В более ранних документах, например в [12], показателем качества препаратов была константа качества. Понятие этого показателя отличается от понятия K_{Δ} . Константа качества — это среднее арифметическое число, получаемое делением суммарного количества баллов, полученных при контроле качества глазных капель, на количество взятых на контроль единиц продукции. То есть, оценка качества проводится по бальной системе в зависимости от количества обнаруженных включений. Величина $K_{\text{кач.}}$, так же как и K_{Δ} , не должна превышать значение 3.5. Но далеко не во всех случаях результаты анализа, полученные по этим двум вариантам, могут совпадать. На наш взгляд, коэффициент дефектности согласно [3] изменил первоначальный смысл константы качества, и его значение 3.5 является искусственно завышенным.

В качестве примера можно рассмотреть следующие результаты сравнительного анализа: из 20 контейнеров глазных капель, взятых для анализа, в 8 контейнерах обнаружено по 1 частице; в 12 — по 3 частицы.

Согласно [3] $K_{\Delta} = 44/20 = 2.2$, то есть препарат соответствует требуемому уровню качества.

Согласно [12] применяется следующая бальная система:

- флаконы, не содержащие загрязнений — 0 баллов за каждый флакон;
- флаконы с единичными включениями (1-2 штуки) типа ворсинок — 2 балла за каждый флакон;
- флаконы, содержащие 3 и более включений — 5 баллов за каждый флакон.

Наличие стеклянных, металлических и других твердых частиц не допускается.

$K_{\text{кач.}} = (8 \cdot 2 + 12 \cdot 5) / 20 = 76 / 20 = 3.8$, то есть препарат не соответствует нормам контроля.

Расхождение для $K_{\text{д}}$ и $K_{\text{кач.}}$ для одной и той же выборки препарата составляет до 40 %.

Для вторичного выборочного визуального контроля глазных капель по показателю «Механические включения», проводимого специалистами отдела контроля качества, а также органами госконтроля, цель которого *подтвердить* результаты первичного контроля, вне зависимости от того, разрушающий он или нет, объем выборки и оценку результатов предложено проводить в соответствии с требованиями математической статистики по ГОСТ 18242-72 [13], действующими в настоящее время в Украине. Аналогичный подход предусмотрен и в [14, 15]. Согласно [13] устанавливаются два типа и семь степеней контроля (четыре специальных и три общих): одноступенчатый и двухступенчатый. Для нашей цели выбираем *двухступенчатый усиленный специальный контроль продукции со степенью II (С-2)*. Специальные виды контроля применяются при разрушающем контроле продукции. Степень контроля II является основной для применения во всех видах контроля.

Для серий глазных капель размером до 150 тыс. штук при степени контроля С-2 выбираем код обозначения выборки 05. Исходя из норматива показателя качества $K_{\text{д}} = 1.5$, установленного для первичного внутрицехового контроля, принимаем число дефектов (частиц) в 100 единицах продукции (контейнерах с глазными каплями) равным 150. Это соответствует объему выборки по 8 изделий на каждой ступени контроля. Для этих характеристик приемочное и браковочное число на первой ступени составляют 15 и 20 дефектов (частиц) соответственно. То есть, если в отобранных 8 контейнерах обнаружено 15 и менее механических частиц — серию принимают с первой выборки, если 20 механических частиц и более — серию бракуют с первой выборки, если от 16 до 19 механических частиц - производят вторую выборку (вторая ступень контроля) в количестве 8 контейнеров. В случае

проведения второй ступени контроля результаты просмотра первой и второй выборок суммируют. При обнаружении в глазных каплях (16 флаконов) 34 механических частиц и менее — серию принимают, 35 механических частиц и более — серию бракуют. Содержание частиц в одном флаконе — не более 3.

Первичный и вторичный контроль *порошков для приготовления глазных капель* на содержание механических включений, учитывая специфику и высокую стоимость производства таких препаратов, предлагаем проводить только согласно [13]. Подходы к установлению объема выборки и норм контроля такие же, как и для глазных капель в полимерных флаконах при вторичном контроле. Однако для данной ЛФ предлагаются менее жесткие показатели качества, что объясняется как спецификой самих препаратов и их производства, так и конечной лекарственной формой, получаемой в результате растворения порошка в предписываемом растворителе. Качество растворителя по показателю «Механические включения» характеризуется коэффициентом дефектности, равным 1.5. Аналогичный подход использован ранее при контроле порошков для приготовления инъекций [16].

Для серий препарата размером до 150 тыс. штук для первичного контроля выбираем код обозначения выборки 05. Принимаем число дефектов (частиц) в 100 единицах продукции (контейнерах с глазными каплями) равным 250. Этим показателям соответствует размер выборки по 8 контейнеров на каждой ступени двухступенчатого контроля.

Для вторичного контроля выбираем код обозначения выборки 04, размер выборки составляет по 5 контейнеров на каждой ступени двухступенчатого контроля при принятом числе частиц 400 в 100 контейнерах с порошками.

Параметры оценки *порошков для приготовления глазных капель* на содержание механических включений при первичном контроле приведены в Табл. 1, при вторичном контроле — в Табл. 2.

Если в отобранных на первой ступени обоих видов контроля 8 или 5 контейнерах обнаружено от 24 до 28 механических частиц, производят вторую выборку (вторая ступень контроля). В случае проведения второй ступени контроля результаты просмотра первой и второй выборок суммируют. Количество частиц в одном флаконе должно быть не более 6. Механические частицы в виде стекла не допускаются.

Выводы

1. Совокупность следующих факторов: разнообразие типов контейнеров (многодозовые, однодозовые, цельные, сборные) для глазных капель материалов, из которых они изготовлены (пластмассы, стекло), лекарственных форм (водные растворы и порошки для приготовления капель), а также фактор первичности применения новых методов контроля, являются основанием необходимости проведения на предприятиях двукратного контроля глазных капель по показателю «Механические включения»:

- для глазных капель в полимерных контейнерах и порошков для приготовления глазных капель - двукратный выборочный разрушающий визуальный контроль (первичный — внутрицеховой выборочный разрушающий контроль, вторичный — выборочный разрушающий контроль ОТК);
- для глазных капель в стеклянных контейнерах - двукратный неразрушающий визуальный контроль (первичный — внутрицеховой 100 % контроль, вторичный — выборочный контроль ОТК).

2. В зависимости от назначения проводимого контроля глазных капель по показателю «Механические включения» (доказывающий или подтверждающий), вида лекарственной формы (водный раствор или порошок для приготовления капель), предложены различные подходы к определению объема выборки и оценке результатов контроля.

3. Обоснованные объемы выборки и нормы контроля положены в основу разработанного проекта нового документа по контролю глазных капель по показателю «Механические включения», отвечающего современным тре-

бованиям к качеству глазных капель и потребностям украинского фармацевтического производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюкова Л.Н. Первичная упаковка офтальмологических растворов: состояние вопроса, проблемы и пути их решения // Фармаком. — 2003. - № 4. — С. 57-63.
2. Андрюкова Л.Н. Первичная упаковка офтальмологических растворов: материалы, используемые для производства контейнеров, и фармацевтическая разработка // Фармаком. — 2004. - № 1. — С. 78-84.
3. Инструкция. Контроль готовых лекарственных средств в виде глазных капель на отсутствие в них механических включений: РД 64-076-89. — М., 1989. - 7 с.
4. Питання контролю очних крапель за показником «Механічні включення»: стан та проблеми / Андрюкова Л.М., Піотровська А.Г., Крупа Н.О. та ін. // Фармаком. - 2005. - № 2/3. — С. 140-144.
5. European Pharmacopoeia. - 5th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2005. - 2781 p.
6. Pharmacopoeia of Japan. - XIV ed. - Tokyo, 2001. - P. 47-48.
7. The International Pharmacopoeia. - 3rd ed. - P. 7-11.
8. British Pharmacopoeia. - V. 1. - London, HMSO, 2001. - 1359 p.
9. Pharmacopoea ufficiale della Repubblica Italiana. — XI ed. — Roma, 2002. — 1230 p.
10. United States Pharmacopoeia. - XXVII ed. - Rockville, 2004.
11. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
12. Временная инструкция по контролю готовых лекарственных средств в виде глазных капель во флаконах на отсутствие в них механических загрязнений: Утв. МЗ СССР 01.12.75 г.
13. ГОСТ 18242-72. Качество продукции. Статистический приемочный контроль по альтернативному признаку. Одноступенчатые и двухступенчатые корректируемые планы контроля. — М.: Государственный комитет стандартов, 1975. — 61 с.
14. ДСТУ 2859-1 — 2001. Статистичний контроль. Вибірковий контроль за альтернативною ознакою. Частина 1. Плани вибіркового контролю, визначені приймальним рівнем якості для послідовного контролю партій. — К.: Держспоживстандарт України, 2001. — 91 с.
15. ГОСТ Р 50779.71-99 (ИСО 2859-1-89). Статистические методы. Процедуры выборочного контроля по альтернативному признаку. Часть 1. Планы выборочного контроля последовательных партий на основе приемлемого

Таблица 1

Объем выборки и параметры оценки порошков для приготовления глазных капель при первичном контроле

Степень контроля	Количество единиц продукции в выборке, шт.		Суммарное количество механических включений (частиц) в выборке, шт.	
	на каждой ступени	суммарное количество единиц	критерий приемлемости	критерий браковки
I	8	8	23	29
II	8	16	52	53

Таблица 2

Параметры оценки порошков для приготовления глазных капель при вторичном контроле

Степень контроля	Количество единиц продукции в выборке, шт.		Суммарное количество механических включений (частиц) в выборке, шт.	
	на каждой ступени	суммарное количество единиц	критерий приемлемости	критерий браковки
I	5	5	23	29
II	5	10	52	53

уровня качества AQL. — М.: Издательство стандартов, 1999. — 73 с.

16. Інструкція. Контроль лікарських засобів для парентерального застосування на механічні включення: КД 42 У—001—93: Затв. МОЗ України 23.12.1993.

Резюме

Андрюкова Л.М.

Обсяг вибірки і норми вмісту часток в очних краплях при контролі їхньої якості за показником «Механічні включення»

У залежності від сукупності різних факторів: різноманітності типів контейнерів (багатодозові, однодозові, цільні, збірні) для очних крапель, матеріалів, із яких вони виготовлені (пластмаси, скло), лікарських форм (водні розчини та порошки для приготування крапель), а також фактора первинності введення нових методів контролю, обґрунтовано підходи до установлення видів контролю обсягів вибірки та норм контролю очних крапель при аналізі їхньої якості на вміст механічних включень. Результати покладено в основу розробленого проекту нового документа з контролю очних крапель за показником «Механічні включення».

Summary

Andryukova L.N.

Amount of sampling and rate of the content of particles in eye-drops at the control their quality by Particulate contamination

Depending on set of the following factors: a variety of containers types (multidose, single-dosage, unbroken, collapsible) for eye-drops, materials of which they were made (plastic, glass), dosage forms (aqueous solutions and powders for preparation of drops), and also the factor of primacy of introduction of a new methods of control approaches to the establishment of types of the control, amount of sampling and norms of the control of eye-drops at the analysis of their quality on the content of particulate contamination were proved. Results based developed project of new document under the control of eye drops by Particulate contamination.

Андрюкова Лариса Николаевна. Окончила Харьковский политехнический институт (1982), Национальный аэрокосмический университет «ХАИ» (2002). Зав. лабораторией глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦЛС (1996). К.фарм.н. (1994). Ст. науч. сотр. (2000). Член Редакционного Совета Государственной Фармакопеи Украины.

УДК 615.457:582.572].07

Андрюкова Л.Н., Георгиевский В.П., Курищук К.В., Назарова Е.С., Сиденко Л.Н., Фетисова Е.Г., Харченко О.В.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»
ЗАО «Трудовой коллектив Киевского предприятия по производству бактериальных препаратов «Биофарма»

К вопросу создания глазных капель на основе экстракта алоэ

Рассмотрены современные требования, предъявляемые к методам контроля качества лекарственных средств из различных видов алоэ. Изложены результаты исследований по разработке состава и методик аналитического контроля глазных капель на основе экстракта алоэ. Приведены данные стабильности глазных капель в процессе хранения.

Современная структура офтальмологических заболеваний населения экономически развитых стран мира характеризуется увеличением количества воспалительных и дистрофических поражений глаз. В связи с этим значительный интерес представляют препараты на основе биологически активных веществ, способных стимулировать репаративные процессы в тканях глаза. Биогенные стимуляторы используются при целом ряде глазных заболеваний: миопическом хориоретините, блефарите, конъюнктивите, помутнении стекловидного тела, прогрессирующей близорукости, кератите, ирите, глаукоме, катаракте и др. [1-3]. Особую актуальность эти вещества приобретают для лечения глазных заболеваний, сопровождающихся деструкцией и нарушением трофики тканей, которые обусловлены не только изначальным нарушением обмена веществ, воздействием инфекционных агентов

или алергизирующих факторов, но и токсическим действием некоторых лекарственных препаратов.

Одним из представителей таких биогенных стимуляторов, широко применяемым офтальмологами, является экстракт алоэ, полученный по методу академика В.П. Филатова из листьев алоэ древовидного. На практике используются различные пути введения этого биогенного препарата: парентерально, энтерально, субконъюнктивально, с помощью электро- и фонофореза. В то же время, несмотря на давние традиции применения алоэ в офтальмологии, такая распространенная лекарственная форма для местного применения, как глазные капли в арсенале врачей до сих пор отсутствует, что связано с трудностями создания водных растворов на основе веществ растительного происхождения. Известно, что в экстрактах из растительного сырья в процес-

се хранения образуется осадок, который при взбалтывании переходит в муть. Экстракт алоэ не является исключением. Однако глазные капли в форме растворов должны быть практически прозрачными и практически свободными от частиц [4].

В мире произрастает более 200 видов алоэ и множество его разновидностей [5]. В Украине в промышленных масштабах культивируется и перерабатывается только алоэ древовидное — *Aloe arborescens* Miller. ГФУ [4] не содержит описания ни одного вида алоэ. В Европейской Фармакопее 5 изд. и Фармакопее США 27 изд. [6, 7] приведены монографии на концентрированный и высушенный сок листьев *Aloe barbadensis* Miller., *Aloe ferox* Miller. и их гибридов, а также на стандартизированный сухой экстракт алоэ. Глазные капли на основе алоэ не описаны ни в одной Фармакопее.

Цель настоящей работы состояла в выборе состава глазных капель на основе экстракта алоэ, а также в разработке и стандартизации методов контроля их качества.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлся экстракт алоэ производства ЗАО «Биофарма», полученный из листьев алоэ древовидного [11, 13]. Водный экстракт представляет собой прозрачную жидкость от светло-желтого до коричнево-желтого цвета, со слабым специфическим запахом. рН экстракта составляет 5.0 - 6.8.

Для выбора состава препарата в качестве вспомогательных веществ использовали химические соединения, соответствующие требованиям Европейской Фармакопее [6]: пропиленгликоль, глицерин, поливинилпирролидон, декстран, твин 80, гидроксипропилметилцеллюлозу, маннит, сорбит, хлоргексидина биглюконат, бензалкония хлорид, пропилпарагидроксибензоат, метилпарагидроксибензоат, а также декаметоксин, соответствующий требованиям ФС 42У-46-152-97.

Работы проводились на лабораторном оборудовании с использованием современных методов исследований и апробацией конечных результатов в условиях промышленного производства.

При разработке состава и технологии получения глазных капель основное внимание уделялось получению как стабильной при хранении, так и комфортной в применении лекарственной формы.

Химическая стабильность данного препарата определяется сохранением заданных физико-химических свойств и агрегатного со-

стояния экстракта алоэ и растворенных в нем вспомогательных веществ.

Для увеличения стабильности препарата изучена возможность использования различных приемов, способствующих предотвращению образования или увеличению растворимости осадка, таких как использование солюбилизаторов, неводных и смешанных растворителей на основе веществ разной химической природы, а также перевод осадка в комплексные соединения. С этой целью в состав глазных капель вводили пропиленгликоль, глицерин, производные целлюлозы, поливинилпирролидон, маннит, сорбит, твин 80, полисахариды и различные их комбинации. Проведенные исследования показали совместимость данных химических соединений с экстрактом алоэ и позволили выбрать оптимальное соотношение веществ, предотвращающее образование осадка в процессе хранения.

Комфортность глазных капель при применении обеспечивается концентрацией ионов водорода и осмотическим давлением (изотоничностью), значения которых должны быть аналогичными соответствующим показателям слезной жидкости или находиться в диапазоне значений, определяемых, как обеспечивающие комфортность [8]. В случае отклонений изотоничность офтальмологических растворов достигается добавлением определенных количеств натрия хлорида, натрия сульфата или натрия нитрата, калия хлорида, маннита, глицерина, глюкозы и др. Экстракт алоэ в своем составе содержит натрия хлорид в концентрации 0.85 %, поэтому нет необходимости в дополнительном введении в глазные капли веществ, создающих осмотическое давление.

рН является важным параметром, оказывающим, с одной стороны, решающее влияние на растворимость и стабильность действующего вещества, а с другой стороны — на переносимость и фармакотерапевтическую активность. Рекомендуемые значения рН для глазных капель находятся в пределах от 3.5 до 9.0 [8]. рН экстракта алоэ находится в пределах от 5.0 до 6.8, что соответствует комфортной области, и сохраняет данное значение в течение 3-х лет. Проведенные исследования показали, что введение в состав глазных капель необходимых вспомогательных веществ не приводит к изменению значения рН как в процессе приготовления раствора, так и в процессе хранения. В связи с этим в состав препарата не введена буферная система.

Одним из требований, предъявляемых к офтальмологическим лекарственным сред-

ствам, является требование сохранения микробиологической чистоты препарата после вскрытия. Этот срок, как правило, не должен превышать четырех недель и достигается введением соответствующих консервантов, обладающих высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов. Для исследований выбраны консерванты различных классов соединений, такие как хлоргексидина биглюконат, декаметоксин, бензалкония хлорид, метилпарагидроксибензоат, метилпарагидроксибензоат с пропилпарагидроксибензоатом и проверена химическая совместимость этих веществ с компонентами глазных капель. На основании проведенных исследований были выбраны оптимальные консерванты и их количества, а также изучена стабильность препарата в процессе хранения и после вскрытия. Правильность выбора антимикробного агента подтверждена микробиологическими исследованиями, о чем будет изложено в следующем сообщении.

В процессе разработки технологии получения глазных капель отработаны такие технологические приемы, как температурный режим растворения ингредиентов, последовательность растворения и смешения компонентов препарата в комбинации с подбором длительности и скорости перемешивания, совместимость раствора глазных капель с различными фильтрующими материалами. Результаты лабораторных исследований воспроизведены в промышленных условиях ЗАО «Биофарма».

Для контроля качества препарата нами разработана аналитическая нормативная документация (АНД) в соответствии с требованиями ГФУ [4]. В проект АНД на *Алоэ, капли глазные* введены следующие показатели: идентификация, прозрачность, pH, объем содержимого упаковки, стерильность, механические включения, количественное содержание.

Контроль качества глазных капель по прозрачности и pH проводится согласно ГФУ [4], объем содержимого упаковки контролируется ОСТ 64-492-85 [9], механические включения — РД 64-076-89 [10].

Исследуемые растворы глазных капель как в момент приготовления, так и в процессе хранения по степени мутности не превышали эталон 1 и характеризовались как прозрачные.

Согласно ГФУ [4] одним из показателей, необходимых для контроля глазных капель, как и для парентеральных лекарственных средств, является цветность. Однако, действующая НТД на экстракт алоэ для инъекций не регламентирует контроль экстракта по данно-

му показателю. Это связано с тем, что цвет экстракта варьирует в довольно широких пределах (от светло-желтого до коричнево-желтого) и часто интенсивнее исходных растворов, используемых для контроля цветности. В связи с этим показатель «Цветность» не был включен в АНД на глазные капли алоэ.

В зарубежных Фармакопеях стандартизация сока алоэ проводится по количественному содержанию гидроксиантраценпроизводных, в пересчете на барбалоин [6, 7]:

- концентрированный и высушенный сок листьев *Aloe barbadensis* Miller. содержит не менее 28.0 % гидроксиантраценпроизводных, в пересчете на барбалоин;
- концентрированный и высушенный сок листьев *Aloe ferox* Miller. - не менее 18.0 % гидроксиантраценпроизводных, в пересчете на барбалоин;
- сухой экстракт алоэ - не менее 19.0 % и не более 21.0 % гидроксиантраценпроизводных, в пересчете на барбалоин.

Согласно действующим в Украине АНД на препараты экстракта алоэ, например, на экстракт алоэ для инъекций [11], стандартизация экстракта алоэ проводится как по содержанию кальциевых солей органических кислот, в пересчете на кальция лактат, так и по содержанию производных гидроксиантрацена. Согласно [12] в соке листьев алоэ древовидного содержится до 2 % антраценпроизводных. Стандартизация лекарственных средств из листьев алоэ древовидного производства ЗАО «Биофарма» проводится по производным гидроксиантрацена, в пересчете на барбалоин:

- в соке из листьев алоэ древовидного содержится не менее 0.05 % гидроксиантрацена, в пересчете на барбалоин [13];
- в водном экстракте — не менее 0.0012 % гидроксиантрацена, в пересчете на барбалоин [14].

В связи с различными методами стандартизации алоэ представляло интерес изучить взаимосвязь между содержанием кальциевых солей органических кислот и содержанием антраценпроизводных. Для определения содержания кальциевых солей органических кислот использовали метод, описанный в АНД на экстракт алоэ для инъекций [11], антраценпроизводных - метод, описанный в [6]. Результаты исследования, представленные в Табл. 1, показывают, что зависимость между содержанием кальциевых солей органических кислот и содержанием антраценпроизводных отсутствует.

Таблица 1

Содержание кальциевых солей органических кислот и антраценпроизводных в различных сериях экстракта алоэ

Серия	Содержание солей кальция в пересчете на кальция лактат, мг/мл	Содержание антраценпроизводных, в пересчете на барбалоин, мг/мл
1	1.95	0.0135
2	2.30	0.0255
3	3.21	0.0234
4	3.15	0.0209

Для идентификации барбалоина и производных алоэзина нами апробирован метод ТСХ [6]. Хроматографирование проводят на пластинках Кизельгель 60 F₂₅₄ в подвижной фазе вода-метанол-этилацетат (13:17:100) с последующим высушиванием, опрыскиванием 10 % спиртовым раствором калия гидроксида, нагреванием при температуре 100 °С в течение 3 мин и просмотром в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме появляется зона ярко-желтой флуоресценции с R_f около 0.4, которая соответствует барбалоину, и зона ярко-голубой флуоресценции с R_f около 0.3, соответствующая алоэзину. Допускается наличие дополнительных зон, в т.ч. на линии старта (Рис. 1).

Для количественного определения суммы производных гидроксиантрацена нами апробирован метод абсорбционной спектрофотометрии в видимой области, описанный в [6] для *Aloe barbados* Miller. Препарат кипятят с раствором железа(III) хлорида и кислотой хлористоводородной с обратным холодильником в течение 4 ч. После охлаждения раствор переносят в делительную воронку, подщелачивают и извлекают производные гидроксиантрацена эфиром. После отгонки растворителя сухой остаток растворяют в метанольном растворе магния ацетата и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 512 нм. Содержание суммы производных гидроксиантрацена пересчитывают на барбалоин, используя удельный показатель поглощения барбалоина, равный 255. Спектры поглощения экстракта алоэ, глазных капель алоэ и плацебо приведены на Рис. 2. Метрологические характеристики данного метода количественного определения приведены в Табл. 2.

На основании результатов количественного определения суммы производных гидроксиантрацена в глазных каплях и с учетом того, что количественное содержание этих веществ в экстракте алоэ должно быть не менее 0.0012 %, установлено, что содержание их в 1 мл препарата должно быть не менее 0.01 мг.

Результаты анализа качества глазных капель алоэ в процессе хранения в естественных условиях представлены в Табл. 3.

Как видно из Таблицы 3, разработанные глазные капли сохраняют стабильность в течение наблюдаемого срока хранения 12 мес.

Выводы

1. Выбран оптимальный состав вспомогательных веществ, позволяющий получить стабильный в процессе хранения офтальмологический лекарственный препарат в форме капель на основе экстракта алоэ.

2. Разработанная в лабораторных условиях технология получения глазных капель на основе экстракта алоэ воспроизводима в условиях промышленного производства ЗАО «Биофарма».

3. Обоснован выбор показателей, позволяющих объективно контролировать качество препарата, разработаны методики их контроля в процессе производства.

Рисунок 1

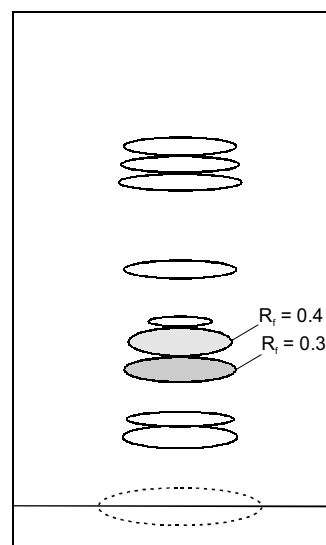
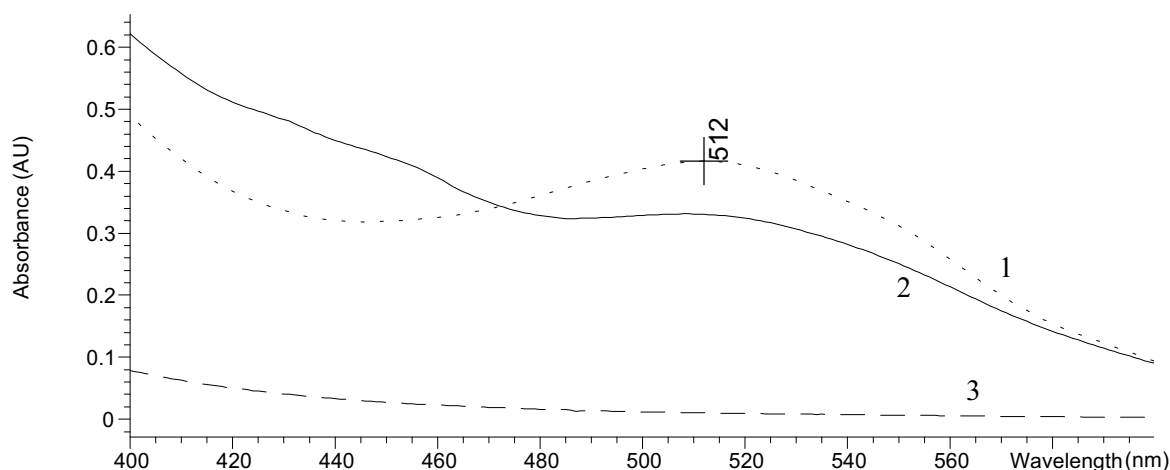


Рисунок хроматограммы препарата при идентификации барбалоина и производных алоэзина

Рисунок 2



"#"	"Name"	"Peaks(nm)"	"Abs(AU)"
1	"1"	512	0.41618
2	"2"	512	0.331154
3	"3"	512	-1.79769E+308

Спектры поглощения экстракта алоэ (1), глазных капель алоэ (2) и плацебо (3) при определении количественного содержания суммы производных гидроксипантотена

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. — Харьков: «Торсинг». - 1997. — Т. 2. - С. 178.
2. Можеренков В.П., Агафонов Б.А. Фитотерапия глазных болезней // Офтальмологический журнал. — 1978. - № 5. — С. 366-369.
3. Логай И.М., Соловьева В.П., Сотникова Е.П. Тканевая терапия по методу В.П. Филатова, основные направления и перспективы ее развития // Там же. — 1995. - № 2. — С. 68-72.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РИРЕГ, 2001. - 556 с.
5. Тропические и субтропические растения закрытого грунта: Справочник / Черевченко Т.М., Приходько С.Н., Майко Т.К. и др. — Киев: Наукова думка, 1988. — С. 70.
6. European Pharmacopoeia. - 5th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2005. — 2779 p.
7. United States Pharmacopeia. - XXVII ed. — Rockville, 2004.
8. Технология и стандартизация лекарств: Сб. науч. тр. — Т. 2. — Харьков: ИГ «РИРЕГ», 2000. — С. 390-391.
9. ОСТ 64-492-85. Средства лекарственные. Допустимые отклонения на промышленное фасование. — М.: Министерство медицинской промышленности, 1985 - 12 с.

Таблица 2

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы производных гидроксипантотена

X _i	X _{ср}	f	S ²	S _x	S _{(x)ср}	P, %	t(P, f)	ΔX _{ср}	ε, %
0.0116	0.0119	5	4.13×10 ⁻⁴	6.43×10 ⁻⁴	2.63×10 ⁻⁴	95	2.57	6.75×10 ⁻⁴	±5.7
0.0114									
0.0129									
0.0113									
0.0118									
0.0125									

Таблица 3

Результаты анализа качества глазных капель алоэ в процессе хранения

Показатели качества	Исходное значение	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.
прозрачность	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
pH	5.2	5.1	5.0	5.1	5.0
механические включения	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
содержание суммы производных гидроксипантотена (мг/мл)	0.0129	0.0125	0.0124	0.0120	0.0131
содержание консерванта (мг/мл)	2.020	2.008	1.996	2.046	1.986

10. РД 64-076-89. Инструкция. Контроль лекарственных средств в виде глазных капель на отсутствие в них механических включений. — М.: Министерство медицинской и микробиологической промышленности СССР, 1989. — 7 с.
11. ВФС 42У-82-1262-99. Экстракт алоэ жидкий для инъекций.
12. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. — М.: Медицина, 1991. — С. 452.
13. ТУ У01.1-32302-465-006:2005. Листя алоє деревоподібного свіжі.
14. АНД. Экстракт алоэ рідкий для ін'єкцій в ампулах.

Резюме

Андрюкова Л.М., Георгієвський В.П., Курищук К.В., Назарова О.С., Сиденко Л.М., Фетисова О.Г., Харченко О.В.

До питання про створення очних крапель на основі екстракту алоє

Розглянуто сучасні вимоги, що висуваються до методів контролю якості лікарських засобів із різних видів алоє. Викладено результати досліджень із розробки складу та методик аналітичного контролю очних крапель на основі екстракту алоє. Наведено дані стабільності очних крапель у процесі зберігання.

Summary

Andryukova L.N., Georgiyevsky V.P., Kurishchuk K.V., Nazarova E.S., Sidenko L.N., Phetisova E.G., Kharchenko O.V.

To the matter of eye-drops creation on the basis of aloes extract

New requirements to methods of quality control of drugs from various species of aloes were considered. Results of studies on development of composition and methods of analytical control of eye-drops on the basis of aloes extract were stated. Data of eye-drops stability during the storage were given.

Андрюкова Лариса Николаевна. Окончила Харьковский политехнический институт (1982), Национальный аэрокосмический университет

«ХАИ» (2002). Зав. лабораторией глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦАС (1996). К.фарм.н. (1994). Ст. науч. сотр. (2000). Член Редакционного Совета Государственной Фармакопеи Украины.

Георгиевский Виктор Петрович. Окончил фармацевтическое отделение 1-го Московского мединститута (1959). Работает в ГП ГНЦАС (с 1958). Д.фарм.н. (1980). Чл.-корр. НАН Украины. Директор ГП ГНЦАС. Директор ГП НЭФЦ. Засл. деятель науки и техники Украины. Руководитель работ по созданию Государственной Фармакопеи Украины.

Курищук Константин Васильевич. Окончил Ивано-Франковский медицинский институт (1978), Институт государственного управления и самоуправления при Кабинете Министров Украины (1993). Магистр государственного управления. Председатель Правления ЗАО «Трудовой коллектив Киевского предприятия по производству бактериальных препаратов «Биофарма».

Назарова Елена Сергеевна. Окончила Харьковский политехнический институт (1993). И.о. ст. науч. сотр. лаборатории физико-химических процессов ГП ГНЦАС. К.фарм н.

Сиденко Лариса Николаевна. Окончила Украинскую фармацевтическую академию (1998). Мл. науч. сотр. лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦАС.

Фетисова Елена Геннагиевна. Окончила Харьковский государственный университет им. Каразина (1995). Мл. науч. сотр. лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦАС.

Харченко Ольга Валериевна. Окончила Харьковский государственный университет им. Каразина (1996). Мл. науч. сотр. лаборатории физико-химических процессов ГП ГНЦАС.

Технологія лікарських засобів

УДК 615.211:615.456

Бегунова Н.В., Алмакаева Л.Г., Шевченко И.В., Науменок Л.Г.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Аспекты технологии приготовления парентеральных растворов на основе калиевой и магниевой солей аспарагиновой кислоты

Представлен сравнительный анализ способов получения калиевой и магниевой солей аспарагиновой кислоты и растворов на их основе. Определены оптимальные технологические параметры солеобразования и приготовления препарата. Выявлены преимущества использования L-аспарагиновой кислоты для получения парентеральных растворов калия и магния аспарагинатов.

При сердечно-сосудистых патологиях, таких как аритмия, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, отравление сердечными гликозидами, гипертоническая болезнь установлено нарушение обмена калия, магния, натрия и кальция, общим моментом которого является обеднение клеток калием и магнием и накопление в них натрия и кальция. С другой стороны, нарушенный электролитный обмен может явиться и непосредственной причиной возникновения указанных заболеваний [1].

Калий является основным внутриклеточным ионом, магний занимает второе место [2]. Содержание ионов калия и магния в организме находится в определенном соотношении. Так, при участии Mg^{+} поддерживается и увеличивается внутриклеточная концентрация калия. С другой стороны, введение ионов калия в кровяное русло способствует повышению уровня магния в сыворотке крови в 2.3 раза. Фармакологическими исследованиями установлено, что при внутривенном введении соли калия менее токсичны в случае комбинации их с солями магния [1, 2].

Таким образом, баланс ионов калия и магния играет важную роль в жизнедеятельности организма.

Для восстановления электролитных нарушений применяют лекарственные средства, содержащие калий и магний в виде солей.

Препараты калиевых и магниевых солей неорганических кислот имеют ряд недостатков, главным из которых является быстрое выведение из организма и не всегда выраженный лечебный эффект, что возможно связано с недостаточным проникновением вводимых катионов внутрь клетки и слабой фармакологической активностью анионов. Поэтому предпочтительнее использовать эти катионы в виде их органических солей. По мнению фармакологов, органические соединения калия и магния обладают большей биодоступ-

ностью, меньшей токсичностью, а также более выраженным терапевтическим эффектом, что обусловлено индивидуальными свойствами органических кислот. Изучалось фармакологическое действие калиевых и магниевых солей пантотеновой, амидникотиновой, лимонной, аспарагиновой, глутаминовой и других кислот [1, 3-5].

Из органических кислот, использующихся для получения препаратов калия и магния, особое место занимают аминокислоты, в частности, кислота аспарагиновая (АК), которая играет важную роль в обмене веществ в организме и обладает рядом ценных фармакологических свойств: усиливает выработку АТФ, стимулирует цикл Кребса, уменьшает гипоксию и нейтрализует аммиак [4].

Изучение препаратов на основе аспарагинатов калия и магния показало их высокую терапевтическую активность при лечении ишемических заболеваний миокарда, особенно при аритмиях, интоксикации сердечными гликозидами и другой патологии [4-7].

В настоящее время за рубежом и в Украине на основе рацемической и оптически активной аспарагиновых кислот и их производных выпускается более 30 лекарственных препаратов. Эти препараты представлены пероральными и парентеральными лекарственными формами. Наличие последних играет важную роль при проведении ургентной терапии для достижения более выраженного фармакологического эффекта.

Среди них — созданные в последние годы отечественные препараты «Аспаркам для инъекций, в ампулах» [8, 9], «Калия и магния аспарагинат для инфузий, в бутылках стеклянных» [10], а также зарубежные препараты: инъекционные растворы — «Панангин» (Венгрия), «Тромкардин» и «Трофикард» (Австрия) [11] и растворы для инфузий — «Тромкардин Е», «Тромкардин К», «Трофи-

кард N» (Австрия) [11], «Раствор калия-магния аспарагинатов» фирмы «Берлин-Хеми» (Германия), «Интертрон» (США), «Спартас» (Япония). Из зарубежных препаратов в Украине зарегистрирован только «Панангин, раствор для инъекций в ампулах».

Описанные в литературе способы получения калиевой и магниевой солей АК основаны на её взаимодействии со стехиометрическими количествами калия гидроксида или карбоната и магния оксида или карбоната, которое, например, в патентах Японии, США и Чехословакии предлагается проводить в водной среде. Продукт реакции выделяют в несколько стадий осаждением при добавлении спирта, в других случаях — высушиванием водной смеси с помощью вакуумной или распылительной сушилки, выпариванием и осаждением органическим растворителем. Это зачастую приводит к комкованию и цементированию субстанции солей при хранении, особенно калиевой соли [12, 13].

Существует способ получения твердых солей аминокислот путем нагревания смеси мелкоизмельченных гидроксидов щелочных металлов и аминокислот или их совместным измельчением, запатентованный в США [14].

Так как однозамещенные аспарагинаты калия и магния представляют собой кристаллогидраты и хорошо растворимы в воде, при их выделении этими способами кристаллизации затруднительно получить соли в устойчивой форме и в мелкокристаллическом состоянии, они могут содержать примеси использующихся при синтезе добавок. В некоторых случаях водные растворы полученных солей непрозрачны.

Среди причин, по которым эти способы не рационально использовать для промышленного производства аспарагинатов калия и магния, также длительность и многостадийность процессов, т.е. технологическая сложность; необходимость эксплуатации дорогостоящего оборудования (вакуумные, распылительные или сублимационные сушилки и др.); большая энергоемкость и высокие трудозатраты; использование в процессе синтеза органических растворителей, горючих и ядовитых вспомогательных веществ, а также дорогостоящих веществ; не всегда достаточный уровень производительности и качества получаемого продукта, для которого зачастую требуется дополнительная очистка.

В литературе есть немногочисленные данные о способах получения водных растворов солей АК, применяемых в медицинской прак-

тике, в которых исключается выделение их в виде кристаллических субстанций.

Так, в патенте Германии описан способ получения стабильного инъекционного раствора на основе калиевой и магниевой солей АК, заключающийся в раздельном получении раствора соли магния из магния оксида или карбоната и АК, и раствора соли калия из калия гидроксида и АК с последующим смешиванием полученных растворов аспарагинатов. Смесь выдерживают последовательно с раствором калия гидроксида, затем с АК при разных температурных режимах и при разных интервалах pH. После охлаждения раствора еще дважды корректируют pH и выдерживают при перемешивании [15].

Для производства парентеральных ЛС на основе калиевой и магниевой солей АК способы их получения из соответствующих реагентов сразу в виде водных растворов являются более рациональными. Это позволяет исключить целый цикл технологических процессов выделения солей в кристаллическом состоянии. Они экономически более целесообразны, но также достаточно трудоемки и длительны. Поэтому актуальной задачей являлась разработка практически более приемлемого способа, выполнимого на технологическом оборудовании фармацевтических предприятий Украины.

Необходимо отметить, что препараты сердечно-сосудистого действия на основе АК в большинстве случаев подразумевают использование D,L-АК, хотя в некоторых странах (Япония, США, Англия) известно применение L-АК с целью повышения эффективности действия. Сравнительное исследование противоритмической активности стереоизомеров аминокислот, в том числе АК, проведенное российскими фармакологами [16, 17], установило, что и L-АК, и D,L-АК оказывают достоверный противоритмический и противofiбрилярный эффект, в то же время отмечено, что L-АК активнее, чем ее рацемат [16].

Таким образом, практический интерес представляют разработка и исследование стабильности парентеральных лекарственных форм монокалиевой и мономагниевого солей, в том числе и на основе L-аспарагиновой кислоты.

В Украине, как и в странах СНГ, отсутствует производство необходимых активных субстанций — солей калия и магния аспарагинатов, но выпускается в промышленных масштабах D,L — аспарагиновая кислота. Сотрудниками ГП ГНЦЛС (Новик И.И. и др.) разрабо-

тана оригинальная технология получения L-аспарагиновой кислоты, основанная на разделении D,L-АК на оптические изомеры.

Учитывая вышеизложенное, при разработке технологии приготовления растворов калия и магния аспарагинатов был использован разработанный нами способ получения этих солей в растворе [9, 18, 19].

Целью настоящей работы является исследование условий протекания реакций солеобразования калия и магния аспарагинатов для определения оптимальных технологических параметров приготовления растворов и изучение стабильности полученных парентеральных лекарственных форм.

Материалы и методы

Объектами исследования были исходные реагенты для получения солей калия и магния аспарагинатов: калия гидроксид, магния оксид, DL- и L-аспарагиновая кислота, а также образующиеся в процессе проведения реакций калия аспарагинат (К-АК) и магния аспарагинат (Mg-АК), являющиеся действующими веществами лекарственного средства. В качестве вспомогательного вещества изучался D-сорбит.

Исследовались 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 рН, порядка введения исходных веществ.

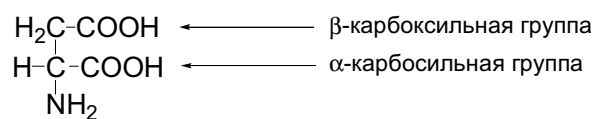
В ходе осуществлявшихся НИР проводился качественный и количественный контроль образцов препарата. В качестве показателей, характеризующих стабильность лекарственного средства, исследовали органолептические показатели (прозрачность, цветность, механические включения), рН раствора, содержание действующих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

Апробация конечных результатов лабораторных исследований проводилась в условиях промышленного производства.

Результаты и их обсуждение

С учетом стехиометрических коэффициентов реакций были рассчитаны количества ингредиентов, необходимые для получения моносолей К-АК и Mg-АК. Содержание калия гидроксида составляет 0.26 моль/л, магния оксида — 0.14 моль/л на 0.54 моль/л АК (для инъекционного раствора) и 58.5 ммоль/л калия

Рисунок



гидроксида и 27.7 ммоль/л магния оксида на 113.9 ммоль/л АК (раствор для инфузий).

Для создания оптимальных условий проведения реакции солеобразования была определена зависимость степени диссоциации АК (Рисунок) от рН среды, с использованием показателей констант ионизации АК для двух карбокисильных групп, для α-карбокисильной группы — 3.9, для β-карбокисильной группы — 9.6. Расчеты показали, что максимальное значение степени диссоциации α-карбокисильной группы АК (свыше 99.0 %), указывающее на полную диссоциацию, достигается при значениях рН выше 6.0. Но при значениях рН среды 8.0 и более происходит диссоциация β-карбокисильной группы, что может приводить к образованию двузамещенных солей АК, не являющихся составной частью исследуемой лекарственной формы. Результаты представлены в Табл. 1.

Таким образом, можно предположить, что оптимальное значение рН раствора для образования монокалиевой и мономагниевого солей АК находится в пределах от 6.0 до 8.0.

Для подтверждения расчетных данных и получения технологических пределов рН, обеспечивающих получение продукта с заданными параметрами по содержанию основных действующих веществ, были приготовлены модельные смеси калиевой соли АК и магниевого соли АК.

Растворы магниевого соли АК готовили из магния оксида и аспарагиновой кислоты. При использовании расчетных количеств указанных ингредиентов были получены растворы, рН которых находился в пределах 6.4 - 6.7. При обработке данных количественного анализа было установлено, что содержание магния аспарагината в них находится в заданных пределах и соответствует 3.20 - 3.54 г магний-иона в 1 л раствора (для инъекционной лекарственной формы) и 0.606 - 0.740 г магний-иона в 1 л раствора (для инфузионной лекарственной формы).

Для приготовления растворов калиевой соли была использована субстанция калия гидроксида (ГОСТ 24363-80, массовая доля основного вещества не менее 85 %), представляющая собой гранулы кристаллической структуры, сильно гигроскопичные, быстро поглоща-

Таблица 1

Зависимость степени диссоциации α -карбоксильной группы и β -карбоксильной группы АК от pH среды

рН раствора	Степень диссоциации α -карбоксильной группы, % (рК = 3.9)	Степень диссоциации β -карбоксильной группы, % (рК = 9.6)
3.8	44.25	0.00
5.0	92.64	0.00
6.0	99.01	0.03
6.5	99.75	0.08
7.0	99.92	0.25
7.5	99.97	0.79
8.0	99.99	2.45
9.0	100.00	20.08
10.0	100.00	28.49
11.0	100.00	71.53
12.0	100.00	99.60
13.0	100.00	99.96
14.0	100.00	100.00

Примечание.

Степень диссоциации (%) = $100 / (1 + 10^{pK_a - pH})$.

ющие на воздухе углекислоту и воду. Содержание основного вещества в них трудно стандартизовать с необходимой степенью точности. Поэтому введение в раствор расчетного количества калия гидроксида требует дополнительного контроля, критерием которого является значение pH. Таким образом, был получен ряд растворов калия аспарагината с различными значениями pH среды и определен их количественный состав. Результаты данных исследований представлены в Табл. 2 и 3. При обработке данных количественного анализа были установлены оптимальные пределы pH для получения раствора калия аспарагината заданной концентрации. Для инъекционного раствора оптимальным является pH от 6.0 до 7.0, что соответствует содержанию 9.80 - 10.85 г калий-иона в 1 л раствора. Для инфузионного раствора оптимальным является pH

от 6.0 до 7.4, что соответствует содержанию 2.059 - 2.517 г калий-иона в 1 л раствора.

Калиевая соль АК в водных растворах диссоциирует на анион АК⁻ и катион К⁺ и подвергается гидролизу с образованием недиссоциированной АК, проявляющей низкую растворимость в воде (0.5 г/100 мл при температуре 25 °С). Для предотвращения гидролиза в раствор необходимо ввести избыточное количество ОН⁻, что позволит уменьшить вероятность образования малорастворимой АК.

Нами рассчитаны константы гидролиза солей: для калиевой соли аспарагиновой кислоты как соли сильного основания и слабой кислоты — $K_r = 8 \cdot 10^{-11}$. Для магниевой соли (слабое основание и слабая кислота) — $K_r = 2.66 \cdot 10^{-18}$. Магниевая соль является более устойчивой, что объясняется особенностями структуры комплекса, в образовании которо-

Таблица 2

Зависимость количественного содержания калий-иона от pH раствора (раствор для инъекций)

Количество калия гидроксида* в гранулах (техническая масса), г	рН	Количественное содержание К ⁺ , г/л (9.80 – 10.85 г/л в препарате)
15.10	5.85	9.48
15.55	6.02	9.76
15.99	6.34	10.03
16.43	6.51	10.31
16.88	6.78	10.59
17.32	6.99	10.87
17.77	7.65	11.15

Примечание.

* — содержание основного вещества по аналитическому паспорту составляет 90.05 %

Таблица 3

Зависимость количественного содержания калий-иона от pH раствора (раствор для инфузий)

Количество калия гидроксида* в гранулах (техническая масса), г	pH	Количественное содержание K ⁺ , г/л (2.059 – 2.517 г/л в препарате)
3.22	5.80	2.048
3.44	6.01	2.060
3.55	6.33	2.224
3.66	6.62	2.288
3.78	6.85	2.290
3.89	6.99	2.375
4.00	7.38	2.508
4.11	7.65	2.523

Примечание.

* — содержание основного вещества по аналитическому паспорту составляет 90.05 %

го участвуют две молекулы АК с образованием координационной связи между атомами Mg и NH₂-группами.

Исследованиями условий протекания реакций солеобразования калия и магния аспарагинатов с учетом их физико-химических характеристик были определены оптимальные технологические параметры приготовления раствора. Установлен температурный режим проведения нейтрализации и последовательность получения солей. При выборе порядка введения исходных веществ учитывалось влияние избытка компонентов (аспарагиновой кислоты) на смещение равновесия реакции в сторону образования продуктов или предотвращения гидролиза, а также возможность образования побочных продуктов, в том числе малорастворимых (магния гидроксид — $K_A = 2,5 \cdot 10^{-3}$, растворимость — 0.642 мг/100 мл) при совместном проведении реакций солеобразования калия и магния аспарагинатов. Установлены оптимальные пределы pH при приготовлении растворов.

Наблюдение за стабильностью раствора при хранении выявило необходимость введения в состав стабилизатора — сорбита в количестве 0.27 моль/л. Оптимальная концентрация стабилизатора была определена в ходе исследований.

Анализ серий препарата, заложенных на хранение, показал, что выбранный состав и технология получения парентеральных растворов на основе калия и магния аспарагинатов обеспечивает стабильность готового продукта в течение 2 лет. Полученные данные стандартизованы в научно-технической документации.

Для сравнительного исследования растворов L- и DL-аспарагинатов калия и магния нами были использованы образцы L-аспарагиновой кислоты, предоставленные лаборатори-

ей ВХФВ ГП ГНЦЛС, которые получены по оригинальной технологии [20, 21], и образцы D,L-АК отечественного производства фармакопейного достоинства, полученные с использованием технологии, предложенной теми же авторами.

Для получения растворов солей калия и магния L-аспарагинатов был применен разработанный и описанный нами [19] тот же оригинальный способ совмещения операций получения этих солей из оксида магния, гидроксида калия и L-аспарагиновой кислоты и перевод их в раствор в диссоциированном состоянии с соблюдением тех же технологических режимов и в тех же терапевтических концентрациях.

Принимая во внимание вывод исследователей о различной способности оптических изомеров аспарагинатов к растворению [22], что часто используется в технологии их разделения, и, возможно, обуславливает различие в стабильности растворов на их основе, нами были для сравнения проведены опыты по получению растворов калия и магния D,L- и L-аспарагинатов.

Установлено, что растворы L-аспарагинатов калия и магния гораздо стабильнее растворов калия и магния D,L-аспарагинатов аналогичных концентраций, а использование для первых стабилизаторов: сорбита и пропиленгликоля еще и значительно удлиняет сроки годности препарата (до 3-х лет). Результаты данного исследования представлены в Табл. 4.

Были также проведены исследования, в результате которых получены растворы калия и магния L-аспарагинатов с концентрацией солей, увеличенной по сравнению с первоначальной в 2, 3 и 4 раза. Это позволяет сделать вывод о том, что растворимость калия и магния L-аспарагинатов выше растворимости калия и магния D,L-аспарагинатов не менее чем

Таблица 4

Изучение стабильности растворов D,L- и L-аспарагинатов калия и магния

Вспомогательные вещества		Газовая защита (азот)	Длительность наблюдения					
сорбит	пропиленгликоль		3-5 ч (после фильтрации)	5-7 ч (после стерилизации)	3.5 мес	2 года	2.5 года	3 года
«Аспаркам для инъекций» на основе D,L-аспарагиновой кислоты								
			-					
5 %			+	-				
	5 %		+	+	-			
5 %		*	+	+	+	+	-	
«Аспаркам для инъекций» на основе L-аспарагиновой кислоты								
			+	+	+	+	-	
		*	+	+	+	+	+	-
	5 %		+	+	+	+	+	-
5 %			+	+	+	+	+	+

Примечания:

* — растворы приготовлены с использованием газовой защиты;

+ — препарат соответствует требованиям АНД;

- — препарат не соответствует требованиям АНД.

в 4 раза. При этом получаемые растворы прозрачны и не наблюдается появление взвеси в процессе приготовления растворов солей, фильтрации и стерилизации ампул и при длительном хранении препарата. Продолжение исследований в этом направлении позволит использовать более широкий ассортимент первичной упаковки препарата, включая мелкоемкие ампулы. Кроме экономического эффекта, это даст возможность расширить число потенциальных производителей препарата, так как не на всех заводах, выпускающих парентеральные препараты, имеется оборудование для крупноемких ампул.

Препарат «L-аспаркам» прошел доклинические испытания. По отчетным данным проф. В.В. Пичугина, зав. кафедрой фармакологии Курского государственного медицинского института, в ходе исследований выявлено наличие у L-аспаркама, в отличие от D,L-аспаркама, выраженных метаболических, коронаролитических и противогипоксических свойств, сочетание которых благоприятно отражается на проявлении кардиопротективной и антиангинальной активности. Последнее указывает на существенные преимущества L-аспаркама, прежде всего по широте спектра кардиотропной активности, при сохранении характерной антиаритмической активности и отсутствии различий в общетоксическом действии в сравнении с D,L-аспаркамом.

Сырьевая база для разработки и производства лекарственных средств на основе D,L-АК или L-АК включает в себя как импортные источники сырья, так и отечественные. Упомя-

нутые выше отечественные промышленно-приемлемые технологии получения D,L-АК и L-АК обеспечивают, в первую очередь, их высокое качество, а также достаточную степень стандартизации производства и продукта, надлежащий уровень техники безопасности, воспроизводство технологии при промышленном масштабировании, максимальную экономичность. Приоритетное развитие производства препаратов с использованием отечественного сырья и технологий обусловлено не только экономической выгодой, но и высоким качеством разработок и получаемых продуктов.

Исходя из вышеизложенного, нами предложен оригинальный способ получения парентеральных растворов калиевой и магниевой солей АК, который осуществляется путем проведения реакции нейтрализации аспарагиновой кислоты магния оксидом и калия гидроксидом в водной среде при повышенной температуре, с добавлением сорбита, при определенных молярных соотношениях компонентов. Полученный раствор выдерживают при температуре 100-102 °С в течение 10-20 мин, охлаждают до температуры 18-22 °С, доводят pH раствора до 6.4-6.5, фильтруют, разливают в емкости, герметизируют и стерилизуют. Получают готовый продукт для инъекций, стабильный в течение регламентированного срока хранения [9].

Выводы

1. Предложенный нами метод получения парентеральных растворов аспарагинатов калия и магния технологически прост, не требу-

ет больших материальных и энергозатрат, процесс не длителен и выполним на технологическом оборудовании, имеющемся на оснащении фармпредприятий, выпускающих парентеральные препараты.

2. В промышленное производство внедрены технологии препаратов «Аспаркам для инъекций, в ампулах», «Калия и магния аспарагинат, раствор для инфузий». Способ получения препарата «Аспаркам для инъекций, в ампулах» защищен патентом Украины.

3. Калиевая и магниевая соли L-аспарагиновой кислоты по сравнению с солями рацемата аспарагиновой кислоты имеют преимущества по растворимости и стабильности их растворов, а также по широте спектра кардиотонической активности.

4. Промышленное производство парентеральных лекарственных средств на основе калиевой и магниевой солей аспарагиновой кислоты для терапии сердечно-сосудистых заболеваний позволит улучшить медикаментозное обеспечение населения Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кистень Н.А. Фармакологическое изучение некоторых органических солей калия и магния: Автореф. дис. ... к.мед.н. - Караганда, 1972. - 23 с.
2. Кошелева Н.Г. Применение препаратов магния в акушерстве и гинекологии // Фарматека. - 2004. - № 6. - С. 100-103.
3. Алиев Х.У., Хакимов Д.А. Антиаритмическое действие некоторых комплексных соединений магния в эксперименте // Анализ, синтез и фармакологическое изучение некоторых физиологически активных веществ. - Ташкент, 1991. - С. 21-25.
4. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заика М.У., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. - Киев: Здоров'я, 1982. - 200 с.
5. Баскович Г.А., Бондина В.А., Кочетков Н.И., Чаплыгина З.А. Глютаминовая и аспарагиновая кислоты в комплексном лечении циркуляторной гипоксии // Патологическая физиология. - 1978. - № 1. - С. 20-25.
6. Хаджай Я.И., Кистень Н.А. Аспаркам // Химико-фармацевтический журнал. - 1981. - Т. 15, № 4. - С. 115-116.
7. Влияние L-аспарагиновой кислоты на углеводно-фосфорный обмен сердечной мышцы в остром периоде экстремального инфаркта миокарда / Якушев В.С., Лифшиц Р.И., Слободин В.В. и др. // Кардиология. - 1972. - Т. 12, № 3. - С. 38-42.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2-х т. - 13-е изд., новое. - Харьков: Торсинг, 1997. - Т. 2. - 592 с.
9. Пат. 14462 Украина, 51А 61К 31/195. Способ 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.
10. Калию і магнію аспарагинат, розчин для інфузій - вітчизняний кардіологічний препарат / Мусянович В.М., Гудзь Н.І., Алмакаєва Л.Г., Затула Є.І., Бегунова Н.В. // Научные направления в создании лекарственных средств в фармацевтическом секторе Украины: Тез. докл. респ. науч. конф. - Харьков, 2000. - С. 88-89.
11. Rote Liste. - Frankfurt/Main: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V. (BPI), 1996.
12. Пат. 4736 Япония, Кл. 16 В 65. Process for the production of K-Mg-salt aspartic acid / Хаяно Кёдзи (Япония) - 4 с.
13. Пат. 23737 Япония, Кл. 3 ОС 42. Process for the production of composite salts L-aspartic acid / Марумо Хироо, Омагуро Фукира (Япония) - 4 с.
14. Пат. 450752 США, Кл. С 07 с 99/00, 101/04. Methods for preparing solid salts of aminoacid / Petrus A. Inelaar, Schalkhaar, Diepenveen, Netherlands. (USA) - 2 с.
15. Пат. 300580 ГДР, МКИ⁵ А 61 К 31/195, 9/08. Verfahren zur Herstellung einer stabilen Injektionslösung mit Metallsalzen der Aspartinsäure, vorzugsweise mit Magnesiumionen / Wehl Joachim, Henning Monika, Brandt Annemarie, Grohmann Ingeborg; Berlin Chemie AG - № 2438070; Заявл. 05.10.82; Опубл. 25.06.92.
16. Сравнительное исследование противоаритмической активности стереоизомеров аминокислот на моделях ранних окклюзионных и гиперфузионных аритмий / Напалкова С.М., Ямашкина И.С., Акулина И.В., Балясова Н.М., Мосина Л.М. // Тез. докл. VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2000. - С. 527.
17. Сравнительное исследование противоаритмической активности стереоизомеров аминокислот на модели адриналиновых аритмий и хлоркальциевой интоксикации у белых мышей / Романова И.С., Костин Я.В., Волкова Н.Д., Кузнецова В.А. // Тез. докл. VIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2001. - С. 611.
18. 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.
19. Алмакаєва 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.
20. А.с. 892868 СССР. МКИ С 07 С 101/22. Способ получения оптически активных изомеров аспарагиновой кислоты / Ясницкий Б.Г., Оридорога В.А., Новик И.И., Габриелян С.М. - 3 с.
21. Розробка промислової технології одержання оптичних ізомерів аспарагінової кислоти / Новік І.І., Оридорога В.О., Бублік М.П., Ковальов І.П. // Фармацевтичний журнал. - № 5. - 1999. - С. 77-81.
22. Tiemann W. Disproportionation of enantiomers by precipitation // Ber. Chemforschungsanstalt Jillich. - 1974. - No. 13. - P. 273-285.

Резюме

Бегунова Н.В., Алмакаєва Л.Г., Шевченко І.В., Науменок Л.Г.

Аспекти технології приготування парентеральних розчинів на основі калієвої та магнієвої солей аспарагінової кислоти

Представлено порівняльний аналіз способів одержання калієвої та магнієвої солей кислоти аспарагінової та розчинів на їхній основі. Визначено оптимальні технологічні параметри солеутворення та приготування препарату. Виявлено переваги використання L-аспарагінової кислоти для одержання парентеральних розчинів калію та магнію аспарагинатів.

Summary

Begunova N.V., Almakayeva L.G., Shevchenko I.V., Naumenok L.G.

Aspects of technology of preparation of parenteral solutions on a basis of potassium and magnesium salts of aspartic acid

Comparative analysis of methods of obtaining of potassium and magnesium salts of aspartic acid and solutions on their basis was offered. Optimal process variables of salifi-

cation and preparation of drug were determined. Advantages of the use of L-aspartic acid for an obtaining of parenteral solutions of potassium and magnesium salts were revealed.

Бегунова Наталья Власовна. Окончила Харьковский государственный 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). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1979). Зав. лаб. инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств (1996). К.фарм.н. (1995). Член Редакцион-

ного Совета Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ).

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

Науменок Людмила Григорьевна. Окончила Пятигорский фармацевтический институт (1982). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1982). Науч. сотр. лаборатории инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств. К.фарм.н. (2004).

Фармакологічні дослідження

УДК 615.454.1:616-001.4:615.28

Лар'яновська Ю.Б., Беркало Н.М.
Національний фармацевтичний університет

Вплив мазі «Веногепар» на морфологічні аспекти експериментального тромбофлебіту у кролів

У статті наведено результати вивчення лікувальної дії мазі «Веногепар» на моделі експериментального тромбофлебіту. У результаті проведення гістологічних досліджень встановлено, що мазь «Веногепар» зменшує проникність стінок, покращує мікроциркуляцію крові в оточуючих тканинах. Відмічено зменшення розмірів тромбу у вені; суттєве зниження запальної реакції у тканинах, що оточують вену; практичну відсутність склеротичних явищ. Препарати порівняння — гель «Аесцин» та мазь гепаринова також знижують поширеність тромбозу у вені та виявляють венопротекторну дію, вираженість якої неоднакова у різних тварин. Гістологічні дослідження підтвердили високу ефективність мазі «Веногепар» та її перевагу перед препаратами порівняння — маззю гепариновою та гелем «Аесцин».

Венозні захворювання через дуже низьку летальність на перший погляд не викликають серйозного занепокоєння і часто розглядаються лише як косметологічний дефект [6, 9, 10, 11, 12, 14]. Проте саме вони можуть стати причиною тяжких ускладнень, серед яких дерматити, екземи, що переходять у гнійне запалення з утворенням абсцесів і флегмон, тромбоемболія легеневої артерії [6, 15, 19]. У віддалені строки після гострого тромбофлебіту можлива прогресуюча хронічна венозна недостатність із виразками гомілки [5, 6, 9, 10, 13, 17, 18, 19]. Ріст венозних захворювань, що спостерігається у наш час, викликає необхідність подальшого вивчення етіології, патогенезу, діагностики на ранніх етапах, а також удосконалення існуючих і пошук нових методів профілактики та лікування [7, 14, 15, 16, 18].

Мазь «Веногепар» — новий препарат, розроблений вченими НФаУ; виробництво мазі планується на ФФ «Дарниця». До складу мазі включено компоненти, що впливають на різні ланки патогенезу захворювання: антикоагу-

лянт прямої дії гепарин, нестероїдний проти-запальний засіб мефенамінова кислота, венопротектор троксерутин, протимікробний та імуномодулюючий засіб мірамістин, а також димексид як провідник компонентів мазі крізь шкіру [2, 6, 7, 19].

Метою даної статті є узагальнення результатів вивчення венопротекторної дії мазі «Веногепар» на моделі експериментального тромбофлебіту у порівнянні з референтними препаратами — маззю гепариновою та гелем «Аесцин».

Матеріали та методи

Для відтворення тромбофлебіту використовували комплексну модель тромбозу у кролів, викликаного розчином Люголю та накладанням лігатури [1, 3, 4].

Експеримент проводили на кролях масою 2-2.5 кг. Тварин розподілили на 5 груп: інтактний контроль; контрольна патологія (тварини, яких після відтворення тромбозу не лікували); три дослідні групи тварин, яких після відтво-

рення патології лікували маззю «Веногепар», гепариновою маззю та гелем «Аесцин». Кролям на зовнішню вену вуха після попередньої депіляції та дезинфекції накладали лігатуру, вище якої внутрішньовенно вводили 0.2 мл розчину Люголю, після чого накладали лігатуру на 4-5 см вище місця ін'єкції. Обидві лігатури знімали через 2 год. Лікування розпочинали через добу після введення розчину Люголю. Для цього дослідним тваринам один раз на добу на уражену ділянку шкіри вуха наносили по 0.5 г мазі. При відпрацюванні експериментальної моделі було встановлено, що після 10-12 доби починається швидко розсмоктування тромбу як у групах тварин, яких лікували, так і у групі контрольної патології. Це можна пояснити тим, що експериментальна патологія була відтворена на здорових тваринах та не повністю відповідає захворюванню у людини. Тому з метою отримання інформативних даних, підтверджених гістологічними дослідженнями, на 10 добу експерименту усіх тварин виводили з досліду під ефірним наркозом шляхом повітряної емболії.

Тварин утримували у стандартних умовах згідно із нормами та принципами Директиви Ради ЄС із питань захисту тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей [8].

Гістологічному дослідженню піддавали сегменти зовнішньої ділянки вуха кролів усіх експериментальних груп за стандартними методиками. Зрізи для оглядової мікроскопії забарвлювали гематоксиліном та еозином.

Результати досліджень та їх обговорення

Як показали проведені дослідження, у інтактних кролів стан стінки зовнішньої вушної вени, перивазальних тканин і всіх елементів шкіри відповідають нормі (Рис. 1).

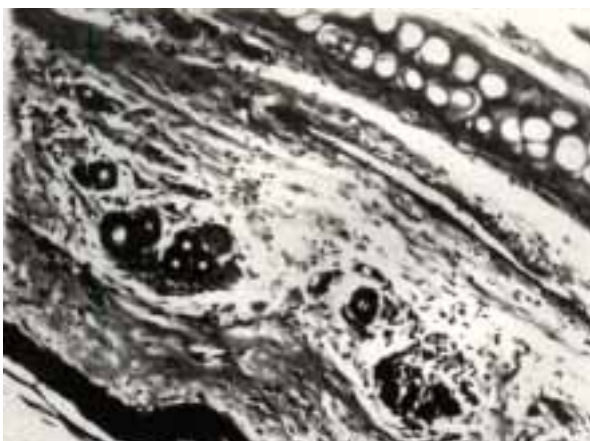
У тварин групи контрольної патології на 10 добу експерименту у місці ін'єкції та дистанційно в обидва боки від нього вена бочкоподібно розширена, закупорена обтураційним щільним тромбом. Стінка вени повністю або частково зруйнована, її структурні шари неможливо розрізнити. Детритичні залишки стінки, тромботичні маси щільно «спаяні» з різко набряклими, гомогенізованими волокнами власне шкіри, що оточують стінку (Рис. 2). Досить часто на подібних ділянках відмічено некроз епідермального шару, виразна лейкоцитарно-макрофагальна інфільтрація. Далі по ходу вени її просвіт залишається значно розширеним. Тромб, що заповнює просвіт, менш щільний, стінка вени збережена, ендотеліаль-

на вистілка відокремлена від стінки вени. У самому тромбі визначено різні фази морфологічної перебудови, ознаки організації та/або реканалізації. Перивазальна тканина розпушена, набрякла. На деяких препаратах навколо вени видно сполучнотканинну капсулу. У власне шкірі дуже часто виражені запальні та гранулематозні процеси, вся судинна система гіперемована, венули та артеріоли часто тромбовані. На самих віддалених, краєвих ділянках гістозрізу вуха вена не проглядається, видно діapedезні крововиливи або поперечний профіль вени, невеликий та повністю закритий організованим тромбом. Колагеновий матрикс власне шкіри дуже часто замінений волокнистою тканиною із впорядкованим розміщенням волокон, часто просякнутий кров'ю. На багатьох ділянках відзначено запальне розростання епідермісу, наявність сукроватицево-некротичної кірочки на його поверхні.

Після лікування маззю «Веногепар» у більшості тварин відзначено позитивну динаміку у стані як зовнішньої вени, так і тканин вуха. Безпосередньо у місці ін'єкції мікроскопічна картина в цілому відповідала такій у групі контрольної патології. Проте дещо більш дистанційно стінка вени не зруйнована. Тромб, що заповнює її просвіт, не має закупорювального, обтураційного характеру. Тканина, що оточує затромбовану вену, набагато менш набрякла та запалена (Рис. 3). На окремих ділянках спостерігали поперечні профілі вени, повністю заповнені сформованим тромбом та оточені сполучнотканинною капсулою або із пристінковим організованим тромбом і вільним для току крові просвітом. На значному ж проміжку просвіт зовнішньої вени розширений помірно, вена прохідна для току крові, судинна стінка відповідає нормі. Власне шкіра практично не змінена, відсутні гіперемія судинної сітки та запальна реакція в ній. Акантозні розростання в епідермісі прослідковуються у меншій мірі, ніж у групі контрольної патології.

У місцях ін'єкції та накладання лігатури стан вени та тканин, що її оточують, у кролів, яких лікували маззю гепариновою, не відрізнявся від контрольної патології. На інших ділянках мікроскопічна картина була дуже варіабельною: просвіт вени бочкоподібно розширений, вільний, містить пристінково еритроцити або залишки тромбу, що викришився. При цьому стінка вени не зруйнована; просвіт розширеної вени закупорений тромбом, що організується, стінка пошкоджена, перивазально видно діapedезні крововиливи; у прос-

Рисунок 1



Сплющений профіль зовнішньої вушної вени інтактного кроля ($\times 200$)

Рисунок 2



Поперечний профіль зовнішньої вушної вени нелікованого кроля ($\times 200$)

Рисунок 3



Поперечний профіль зовнішньої вушної вени кроля, лікованого маззю «Веногепар» ($\times 150$)

Рисунок 4



Поперечні профілі зовнішньої вушної вени кроля, лікованого гепариноюю маззю ($\times 150$)

Рисунок 5



Поперечний профіль зовнішньої вушної вени кроля, лікованого гелем «Аесцин» ($\times 150$)

віті вени містяться нещільні тромби, які знаходяться у різних фазах морфологічної перебудови, щільно «спаяні» з волокнистою тканиною, яка оточує вену (Рис. 4). Відносно невеликі ділянки зовнішньої вени практично не змінені. Запальна клітинна реакція, деструкція колагенового матриксу виражені значно менше, ніж у групі контрольної патології.

При лікуванні гелем «Аесцин» приблизно у половини кролів зовнішня вена вуха на досить значному проміжку гістозрізу (як у місці ін'єкції, так і дистанційно в обидва боки від неї) значно розширена, закупорена червоним тромбом. Стінка вени зруйнована, тканина, що її оточує, набрякла. Більш віддалено уздовж вени зустрічаються ділянки, на яких просвіт вени закритий тромбом з ознаками організації, що розпочинається, а стінки вени щільно

прилягають до волокнистої тканини, яка її оточує (Рис. 5). У інших кролів зміни вени менш виражені. В основному просвіт помірно розширений, стінка не зруйнована. На окремих її ділянках у перивазальних тканинах, що прилягають, відзначена незначна клітинна реакція. У краєвих ділянках зрізу вуха спостерігали поперечні профілі вени, заповнені організованим тромбом. При цьому відзначали гіперемію судинної сітки у тканині поряд з веною.

Висновки

Одержані дані дозволяють зробити такі узагальнення:

- ін'єкція розчину Люголю та короточасне накладання лігатури викликає у зовнішній вені вуха кролів поширений тромбоз, руйнування стінки вени, екстравазуючі запальні та гранулематозні процеси;
- мазь «Веногепар» зменшує проникність стінок, покращує мікроциркуляцію крові в оточуючих тканинах. Відмічено зменшення розмірів тромбу у вені. Набагато знижено запальну реакцію у тканинах, що оточують вену, практично відсутні склеротичні явища;
- препарати порівняння — гель «Асцин» та мазь гепаринова також знижують поширеність тромбозу у вені та виявляють венопротекторну дію, вираженість якої не однакова у різних тварин. За даними вивчення морфоструктури вени, тромбу та оточуючих тканин обидва препарати порівняння поступаються за інтенсивністю та стабільністю лікувального ефекту у всіх тварин перед маззю «Веногепар».

Таким чином, на моделі експериментального тромбофлебиту мазь «Веногепар» виявляє виражений венопротекторний ефект, що підтверджено гістологічними дослідженнями.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гацуря В.В., Сернов Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии. — М.: Медицина. — 325 с.
2. Компендиум 2001/2002 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: МОРИОН, 2001. — 1536 с.
3. Малоштан Л.Н., Должикова Е.В. Специфическое действие антикоагулянтного препарата апивен на модели периферического тромбообразования // Лекарства — человеку - Т. XVI. - 2001. - С. 348-351.
4. Моделирование заболеваний / Под ред. С.В. Андреева. - М.: Медицина, 1973. — С. 157— 163.
5. Современные представления о хронической венозной недостаточности // Рефераты симпозиума в рамках 14 Всемирного конгресса Международного союза флебологов. 2001, Италия. — М.: ООО «Митра-пресс», 2001. — 18 с.
6. Флебология: Руководство для врачей / Под ред. В.С. Савельева. — М.: Медицина, 2001. — 664 с.

7. Харкевич Д.А. Венотропные (флеботропные) средства // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2004. — Т. 67, № 1. — С. 69—77.
8. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. — К.: МОРИОН, 1999. — С. 508-545.
9. Diebschlag W, Nocker W., Lehmacher W., Rehn D. A clinical comparison of two doses of O-(β-hydroxyethyl)-rutosides (oxerutins) in patients with chronic venous insufficiency // J. Pharm. Med. — 1994. — No. 4. — P. 7-14.
10. Hirsh J., Goldhaber S.Z. Prevention of venous thromboembolism. — New-York: M. Dekker, 1993. — 143 p.
11. Hirsh J., Salman E.W. Pathogenesis of venous thromboembolism // Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice — 1987. — No. 7 — P. 58-65.
12. Haenen G., Jansen F., Bast A. The antioxidant properties of five o-(β-hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venoruton // Phlebology. — 1993. — No. 8. - Suppl 1. — P. 10-17.
13. Jimenez Cossio G.A. Epidemiology of chronic venous insufficiency // Cardiovasc. Drugs. — 1995. — No. 5. - P. 78-95.
14. Lechter A. Pelvic and vulvar varices. Quality Medical Publishing. — St. Louis, Missouri, 1999. — P. 245—448.
15. Nees S, Juchem G, Fink R, Arbogast H. Influence of polymorphonuclear venular endothelial cells // Sixth World Congress for Microcirculation, 1996. — P. 401-404.
16. Roland I., Bougelet C., Ninane N., Arnould T., Michiels C., Remade J. Effect of hydroxyethylrutosides on hypoxial-induced neutrophil adherence to umbilical vein endothelium // Cardiovasc. Drugs Ther. — 1998. — No. 12. — P. 375-381.
17. <http://www.msa.cv.ua>
18. <http://www.trombosis.net>
19. <http://www.varicoseveinstreatment.com/whatis.jsp>

Резюме

Ларьяновкая Ю.Б., Беркало Н.М.

Влияние мази «Веногепар» на морфологические аспекты экспериментального тромбофлебита у кролей

В статье приведены результаты изучения лечебного действия мази «Веногепар» на модели экспериментального тромбофлебита. В результате проведения гистологических исследований установлено, что мазь «Веногепар» уменьшает проницаемость стенок, улучшает микроциркуляцию крови в окружающих тканях. Отмечено уменьшение размеров тромба в вене; значительное снижение воспалительной реакции в тканях, окружающих вену; практическое отсутствие склеротических явлений. Препараты сравнения — гель «Асцин» и мазь гепариновая также уменьшают распространенность тромбоза в вене и оказывают венопротекторное действие, выраженность которого неодинакова у разных животных. Гистологические исследования подтвердили высокую эффективность мази «Веногепар» и её преимущество перед препаратами сравнения — мазью гепариновой и гелем «Асцин».

Summary

Laryanovska Yu.B., Berkalo N.N.

Influence of Venogepar ointment on morphological aspects of experimental trombophlebitis in rabbits

In the article results of the study of Venogepar ointment therapeutic effect at the model of experimental trombophlebitis were given. At the result of histological study was established that Venogepar ointment decreased wall permeability, improved microcirculation of the blood in enclosing tissues. The thrombus miniaturize in vein; significant decrease

of inflammation in enclosing vein tissues; practical absence of sclerotic effects were established. Referent preparations — Aescin gel and heparin ointment also reduced thrombosis prevalence in vein and showed venoprotective effect, which expressiveness different at different animals. Histological study has confirmed high-performance of Venogepar ointment and its advantage before referent preparations — heparin ointment and Aescin gel.

Лар'яновська Юлія Борисівна. Закінчила Харківський державний університет (1969). К.б.н. (1989). Ст. наук. співр. ЦНДЛ НФаУ.

Беркало Наталія Миколаївна. Закінчила НФаУ (2000). Аспірант ЦНДЛ НФаУ.

УДК 615.212:615.27:615.276.015

Щокіна К.Г., Вікторов О.П., Супрун Е.В., Іщенко О.М., Коваленко Є.М.

Національний фармацевтичний університет

Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеско АМН України

Науково-дослідний інститут особливо чистих біологічних препаратів, м. Санкт-Петербург

Порівняння антипроліферативної активності сучасних та перспективних протизапальних засобів

Проведено експериментальне порівняльне дослідження антипроліферативної дії індометацину, диклофенаку, піроксикаму, мелоксикаму, целекоксибу, АРІА-1, амізону, антиоксидантів супероксиддисмутази (рексоД) і кверцетину на моделі «ватяної» гранульоми у щурів. Відповідно до результатів проведених досліджень, при лікуванні запальних захворювань із вираженою проліферацією рекомендується застосування піроксикаму, індометацину, АРІА-1.

На останніх етапах запального процесу провідна роль належить процесу проліферації. Ця стадія запалення характеризується розвитком грануляційної тканини в осередку ураження [7, 10, 13]. Досвід вивчення різноманітних запальних процесів свідчить про те, що за певних умов репаративна реакція може перейти у хронічний патологічний процес [11, 14]. Для запобігання переходу регенерації у дисрегенерацію (патологічну проліферацію) у клініці призначаються нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) [6, 11, 17].

Арсенал сучасних НПЗЗ постійно збільшується, сьогодні на ринку України дану фармакологічну групу складають близько 500 препаратів (на основі більш як 80 субстанцій) у різних лікарських формах, які відрізняються особливістю дії та специфікою використання. Щорічно у клінічну практику впроваджуються нові протизапальні засоби. Вони активно вивчаються у доклінічних і клінічних дослідженнях [1, 4, 15, 16, 20]. Дані літератури з питань впливу сучасних НПЗЗ на процес проліферації суперечливі, тому що експериментальні та клінічні дослідження активності цих препаратів були проведені різними авторами, у різні пори року, у неоднакових умовах, на різних моделях, із використанням різних показників для оцінки активності препаратів, що не дає змоги коректно порівнювати їх за антипроліферативною дією [9, 10, 12, 22, 23].

Тому становило інтерес в ідентичних умовах експерименту порівняти вплив препаратів різних груп, що мають протизапальні власти-

вості, зумовлені різними механізмами дії, на розвиток запалення з перевагою проліферації на моделі «ватяної» гранульоми у щурів.

Вибір моделі обумовлений її інформативністю (вираженістю процесів альтерації) [3].

Для порівняльного вивчення були відібрані препарати з вираженою протизапальною дією та традиційним механізмом дії із групи НПЗЗ, що успішно використовуються для лікування запально-дистрофічних захворювань опорно-рухової системи: індометацин, диклофенак, піроксикам, мелоксикам; НПЗЗ нового покоління: високоселективний інгібітор циклооксигенази-2 целекоксиб, новий ненаркотичний анальгетик із вираженими протизапальними властивостями амізон; антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІА-1), одержаний у Санкт-Петербурзькому науково-дослідному інституті особливо чистих біологічних препаратів (НДІ ОЧБП), що специфічно блокує цитокінові рецептори і сприяє зниженню далекодистанційних ефектів ІЛ-1; антиоксиданти: рибонуклеотидна супероксиддисмутаза (рексоД) і кверцетин, що є перспективними протизапальними препаратами з нетрадиційним (нециклооксигеназним) механізмом дії [2, 5, 14, 20, 23].

Матеріали і методи

Модель «ватяної» гранульоми у щурів відтворювали відповідно до [3].

Досліджувані препарати вводили 1 раз на добу протягом 8 днів у вигляді розчинів або суспензій внутрішньошлунково у $E_{d_{50}}$ (за анти-

проліферативним ефектом): індометацин із розрахунку 10 мг/кг, диклофенак - 8 мг/кг, піроксикам - 12 мг/кг, мелоксикам - 1 мг/кг, целекоксиб - 3 мг/кг, амізон - 170 мг/кг, кверцетин - 5 мг/кг; рексод та АРІЛ-1 - внутрішньочеревно у дозі 0.02 мг/кг та 3 мг/кг, відповідно.

Дослідження проведено із дотриманням правил гуманного поводження із тваринами, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [3].

Оскільки ED_{50} досліджуваних препаратів за антипроліферативною дією раніше були визначені різними авторами, ми одержали ці дані з літературних джерел: ED_{50} індометацину, піроксикаму, диклофенаку — [3], ED_{50} целекоксибу — [10], мелоксикаму — [10, 12], рексоду — [5], кверцетину — [8], амізону — [2], АРІЛ-1 — [16].

На 9 добу тварин виводили з експерименту та визначали антипроліферативну активність досліджуваних препаратів (у відсотках) за їх здатністю пригнічувати утворення грануляційної тканини у порівнянні з контрольною патологією.

Для одержання максимально об'єктивних результатів в експерименті були використані групи по 8-10 щурів, приблизно однакового віку і ваги (190-210 г). Експерименти проводилися в одну пору року (восени), протизапальні засоби вводилися в однаковий час доби (ранок) для виключення хронофармакологічних розходжень в активності порівнюваних препаратів (за даними хронофармакологічних досліджень НПЗЗ найбільш активні восени та навесні [4]).

Результати експерименту представлені в Таблиці.

Результати та їх обговорення

Як видно з Таблиці, всі досліджувані препарати в різному ступені пригнічували процес проліферації тканини в осередку запалення.

Найбільш виражену антипроліферативну активність виявили піроксикам (41.4 %), індометацин (39.0 %) та АРІЛ-1 (37.9 %). Амізон, рексод, мелоксикам і целекоксиб виявили схожі результати пригнічення утворення грануляційної тканини (20.2. % - 28.0 %).

Диклофенак і кверцетин виявили лише тенденцію до гальмування процесу проліферації, зменшуючи утворення грануляційної тканини на 17.3 % і 14.9 %, відповідно.

За здатністю пригнічувати розвиток грануляційної тканини в осередку запалення досліджувані препарати можна розташувати у такій послідовності: піроксикам (41.4 %) \geq індометацин (39.0 %) \geq АРІЛ-1 (37.9 %) $>$ амізон (28.0 %) \geq рексод (26.1 %) \geq целекоксиб (24.3 %) $>$ мелоксикам (20.4 %) $>$ диклофенак (17.3 %) \geq кверцетин (14.9 %).

Маса грануляційної тканини у групах тварин, лікованих піроксикамом, індометацином, АРІЛ-1 та амізоном вірогідно не відрізняється та вірогідно більше, ніж маса тканини у групах, лікованих мелоксикамом, целекоксибом та рексодом. Маса грануляційної тканини у тварин, лікованих диклофенаком та кверцетином, вірогідно не відрізняються від аналогічного показника у групі контрольної патології. Отже, найбільшу антипроліферативну активність у проведеному дослідженні виявили піроксикам, індометацин, АРІЛ-1.

Таблиця

Антипроліферативна активність досліджуваних препаратів

Препарати	Доза (мг/кг)	Маса грануляційної тканини, мг	Активність, %
контрольна патологія	-	38.2 \pm 2.6	-
індометацин	10.0	23.3 \pm 1.9*	39.0
диклофенак	8.0	31.6 \pm 1.4**/•/••	17.3
піроксикам	12.0	22.4 \pm 1.8*	41.4
мелоксикам	1.0	30.4 \pm 2.2*/**/•/••	20.4
целекоксиб	3.0	28.9 \pm 1.8*/**/•/••	24.3
амізон	170.0	27.5 \pm 2.8*	28.0
рексод	0.02	25.2 \pm 1.3*/**/•/••	26.1
АРІЛ-1	3.0	23.8 \pm 1.1*/**/•/••	37.9
кверцетин	5.0	32.5 \pm 1.9**/•/••	14.9

Примітки:

- * — вірогідно по відношенню до контрольної патології;
- ** — вірогідно по відношенню до індометацину;
- — вірогідно по відношенню до піроксикаму;
- — вірогідно по відношенню до АРІЛ-1.

Виразена антипроліферативна активність піроксикаму, індометацину та АРІЛ-1 пояснюється, напевно, їх високою здатністю пригнічувати синтез колагену, що позитивно впливає на проліферативні зміни [13, 16, 19, 21, 23]. Інші препарати менше впливають на синтез колагену, тому виявляють помірну антипроліферативну дію.

Висновки

Відповідно до одержаних результатів можна передбачати, що при лікуванні запальних захворювань із перевагою проліферації, коли розростання грануляційної тканини може призвести до незворотних деформацій та обмеження рухливості суглобів (репаративна фаза ревматоїдного артриту, ювенільного РА, анкілозуючий спонділоартрит (хвороба Бехтерева), остеоартроз, остеохондроз, спонділоартроз, сакроіліїт, періартропатія, спонділоз та ін.), пропонується використання піроксикаму, індометацину, АРІЛ-1, тому що в експерименті на моделі "ватної гранульоми" вони виявили найбільш виразну антипроліферативну активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барсукова Е. Эффективность и безопасность современных НПВС // Аптека. — 2004. - № 46 (467). — С. 7.
2. Бухтиарова Т.А. Экспериментальное обоснование направлений поиска и изучение новых неопиатных анальгетиков в ряду производных азотистых гетероциклов: Дис. ... д.мед.н. - Киев, 1998. - 330 с.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
4. Рациональное застосування нестероїдних протизапальних препаратів при лікуванні захворювань суглобів: Методичні рекомендації / Зупанець І.А., Коваленко В.М., Дзяк Г.В. та ін. — К.-Х., 2002. — 23 с.
5. Клинико-экспериментальное обоснование применения супероксиддисмутазы в медицине / Стефанов А.В., Деримедведь Л.В., Дрогозов С.М., Чурилова И.В., Куценко Т.А., Щекина Е.Г. — Харьков: Изд-во НФаУ, Золотые страницы, 2004. — 288 с.
6. Насонов Е.Л. Нестероидные противовоспалительные препараты при ревматических заболеваниях: стандарт лечения // РМЖ. — 2001. - № 9 (7-8). — С. 20-25.
7. НПВП: реальность и перспективы в лечении заболеваний суставов // Здоров'я України. — 2003. - № 21 (82). — С. 25.
8. Сахарова Т.С., Яковлева Л.В., Горбань Є.М. Экспериментальне вивчення кардіопротекторної активності альтану порівнянно з кверцетином // Одесский медицинский журнал. — 2002. - № 1. — С. 19-22.
9. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Нестероидные противовоспалительные средства. — Смоленск, 1997. — 70 с.
10. Шварц Г.Я. Современные нестероидные противовоспалительные средства. — М.: «Реафарм», 2002. — 40 с.
11. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses / Arai K., Lee F., Miyajima A. et al. // Ann. Rev. Biochem. - 1990. — No. 59. — P. 783.
12. Efficacy and tolerability of meloxicam, COX-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug / Del Tacca M., Colucci R., Fornai M., Blandizzi C. // Clin. Drug Invest. — 2002. — No. 22 (12). - P. 799-818.
13. Diaz-Gonzalez F., Sanchez-Madrid F. Inhibition of leucocyte adhesion: an alternative mechanism of action for inflammatory drugs // Immunol. Today. — 1998. — Vol. 19. — P. 169-172.
14. Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease // Blood. - 1996. - Vol. 87, No. 6. - P. 2095-2140.
15. Efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, in the treatment of ankylosing spondylitis: a six-week controlled study with comparison against conventional nonsteroidal antiinflammatory drugs / Dougados M., Behier J.M., Jolchine L. Et al. // Arthritis Rheum. — 2001. — No. 44 (1). — P. 180-185.
16. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease / Essayan D.M., Fox C., Levi-Schaffer F., Alam R., Rosenwasser L.J. // J. of Allergy and Clinical Immunology. - 1998. - Vol. 102, No. 3. - P. 127-144.
17. Kolaczowska E. Cyclooxygenases II. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Their Inhibitor // Cell Biology. — 2002. — No. 29. — P. 533-554.
18. Lichtenstein D.R., Wolfe M.M. COX-2-selective NSAIDs // Journal of the American Medical Association. — 2000. — No. 13 (284). — P. 1297-1299.
19. Livingston A. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs // Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. — 2000. — No. 30. — P. 773-782.
20. Guidance on the use of cyclooxygenase (COX) II selective inhibitors, celecoxib, rofecoxib, meloxicam and etodolac for osteoarthritis and rheumatoid arthritis // Technology Appraisal Guidance. — 2001. - No. 27.
21. Neta R., Oppenheim J.J., Durum S.K. The cytokine concept: historical perspectives and current status of the cloned cytokines // Lymphokines and the Immune Response. - Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990. - P. 29-42.
22. Orlewska E. The cost-effectiveness of celecoxib compared to diclofenac in patients with rheumatoid arthritis in Poland // Value of Health. — 2001. — No. 6. — P. 483.
23. Skelly M.M., Hawkey C.J. Potential alternatives to COX-2 inhibitors // BMJ. — 2002. — No. 324. - P. 1289-1290.

Резюме

Щекина Е.Г., Викторов А.П., Супрун Э.В., Ищенко А.М., Коваленко Е.Н.

Сравнение антипролиферативной активности современных и перспективных противовоспалительных средств

Проведено экспериментальное сравнительное исследование антипролиферативного действия индометацина, диклофенака, пироксикама, мелоксикама, целекоксиба, АРІЛ-1, амизона, антиоксидантов супероксиддисмутазы (рексод) и кверцетина на модели «ватной» гранулемы у крыс. Согласно результатам проведенных исследований, при лечении воспалительных заболеваний с выраженной пролиферацией рекомендуется использование пироксикама, индометацина, АРІЛ-1.

Summary

Shchokina E.G., Viktorov A.P., Suprun E.V., Ishchenko A.M., Kovalenko E.N.

Comparison of antiproliferative effect of modern and perspective antiinflammatory preparations

Experimental comparative study of antiproliferative effect of indometacin, diclofenac, piroxicam, meloxicam, celecoxib, I-1RA, amizon, antioxidants of superoxide dismutase (rexod) and quercetin on model «wadded» granuloma in rats was conducted. According to results of conducted studies, at the treatment of inflammatory diseases with distinct proliferation, use of piroxicam, indometacin, I-1RA is recommended.

Щокіна Катерина Геннадіївна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (НФаУ) (2001). Асистент кафедри фармакології НФаУ (від 2001).

Вікторов Олексій Павлович. Д.мед.н. Професор. Зав. відділу клінічної фармакології з лабораторією функціональної діагностики Інституту кардіології ім. акад. М.Д. Стражеско АМН України.

Супрун Еліна Владиславівна. Закінчила Харківський медичний інститут (1989). К.мед.н. (2000). Доцент кафедри фармакології НФаУ.

Ищенко Олександр Мітрофанович. Д.х.н. Професор. Зав. відділу НДІ особливо чистих біологічних препаратів (м. Санкт-Петербург).

Коваленко Євген Миколайович (н. 1978). Закінчив НФаУ (2001). Асистент кафедри фармакології НФаУ (від 2003).

УДК 615.22:616.127

Григор'єва Г.С., Белік Г.В., Дроговоз С.М., Столетов Ю.В.
Національний фармацевтичний університет
Інститут фармакології та токсикології АМН України

Порівняння кардіопротекторних властивостей ліпосомальної та водорозчинної лікарських форм кверцетину

Проведено дослідження кардіопротекторних властивостей ліпосомальної форми кверцетину на моделі адреналінового міокардиту у щурів. У ході експерименту встановлено, що ліпосомальна форма кверцетину, яку вводили у профілактичному режимі, виявила виражену дію на інгібування процесів ВРО, цитолізу, нормалізацію рівня відновленого глутатіону у крові та міокарді та сприяла покращенню метаболічних та електрофізіологічних процесів у міокарді. Така дія ліпосомальної форми кверцетину була більш ефективною, ніж дія водорозчинної форми кверцетину. Результати досліджень дозволяють рекомендувати використання ліпосомальної форми кверцетину в комплексній терапії міокардитів.

Оксидантний стрес — патогенетичний фактор, що займає важливе місце в розвитку міокардитів [6, 14, 15]. Тому в останні роки спостерігається підвищена зацікавленість до шляхів корекції вільнорадикальної патології серця [7, 13, 18]. Серед антиоксидантів перспективними є ліки флавоноїдної структури [6, 8, 17, 18]. Препаратом флавоноїдної структури є кверцетин, що виявляє кардіопротекторні, антиоксидантні, мембранопротекторні, протизапальні ефекти та, завдяки цим властивостям, з успіхом застосовується у кардіологічній практиці [3, 5, 7, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 19]. Але використання цінних фармакологічних властивостей кверцетину обмежується низькою біологічною доступністю лікарських форм кверцетину (гранули, порошок), що зумовлено поганою розчинністю кверцетину в біологічних рідинах організму та неможливістю вводити його парентерально.

Останнім часом у медичній практиці застосовується ін'єкційна водорозчинна форма кверцетину — препарат «Корвітин» виробництва НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (м. Київ), що є комплексом кверцетину та полівінілпіролідону, по 0.5 г у флаконі. Корвітин вводили щурам внутрішньовенно в дозі 31.5 мг/кг, в якій міститься 3.15 мг кверцетину [4].

Вченими інституту фармакології та токсикології АМН України була розроблена нова

ін'єкційна ліпосомальна форма кверцетину (ЛФК) — препарат «Ліпофлавіон», до складу якого входить кверцетин, лецитин (фосфатидолін) і лактоза. Ліпофлавіон виробляє ЗАТ «Біолік» (м. Харків). ЛФК вводили щурам внутрішньовенно в дозі 94 мг/кг. Ця умовно-терапевтична доза Ліпофлавіону була визначена у попередніх експериментальних дослідженнях на моделі доксорубіцинової кардіоміопатії [1]. Це сумарна доза, що містить 2.5 мг кверцетину.

Метою даної роботи було проведення порівняльного аналізу кардіопротекторних властивостей ліпосомальної та водорозчинної форм кверцетину.

Матеріали та методи

Дослідження з порівняння кардіопротекторної дії лікарських форм кверцетину проводили на одній з основних моделей ішемічного ураження міокарду — адреналіновому міокардиті серцевого м'яза, що перебігає за типом численних дрібноосередкових некрозів [2, 18, 19].

Під час експерименту тварин утримували у стандартних умовах згідно з міжнародними нормами та принципами із питань захисту тварин, яких використовують для експериментальних та інших цілей [11].

Досліджувані препарати вводили протягом 4 діб у профілактичному режимі. На п'яту добу через 1 годину після внутрішньовенного введення препаратів викликали патологію внутрішньом'язовим введенням 0.18 % розчину адреналіну гідрохлориду дрібно через кожні 10 хв у дозі 0.8 мг на тварину [2]. На шосту добу знімали ЕКГ і виводили тварин з експерименту. Для оцінки кардіотоксичної дії адреналіну гідрохлориду, а також кардіопротекторних властивостей ліпосомальної та водорозчинної форм кверцетину порівнювали показники ЕКГ. Активність цитолітичних процесів та ступінь проліферації тканини міокарду оці-

нювали за вмістом аспартатамінотрансферази (АсАТ) у сироватці крові та за коефіцієнтом маси серця (КМС). Інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) — за вмістом ТБК-активних продуктів, рівнем відновленого глутатіону (G-SH) у гомогенаті міокарду та сироватці крові. Крім того, враховували виживання тварин.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень наведені у Табл. 1, 2. Адреналінове ураження міокарду виявилось гострими ішемічно-некротичними процесами. На тлі застосування адреналіну гідрохло-

Таблиця 1

Вплив лікарських форм кверцетину на показники електрокардіограми при адреналіновому міокардиті у щурів

Показник	Умови експерименту			
	Інтактний контроль (n=8)	Контрольна патологія (n=5)	Ліпофлавон, 94 мг/кг (n=7)	Корвітин, 31.5 мг/кг (n=6)
ЧСС, уд./хв.	396.53 ± 16.79	539.48 ± 12.2*	434.88 ± 20.16**	439.29 ± 24.27**
PQ, с	0.044 ± 0.002	0.026 ± 0.002*	0.04 ± 0.002**	0.04 ± 0.002**
QRS, с	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.017 ± 0.002
QT, с	0.09 ± 0.001	0.049 ± 0.005	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.009
R, мВ	0.54 ± 0.06	0.38 ± 0.04*	0.53 ± 0.08**	0.52 ± 0.073**
P, мВ	0.098 ± 0.013	0.035 ± 0.007*	0.08 ± 0.017**	0.05 ± 0.017**
T, мВ	0.142 ± 0.02	0.07 ± 0.01*	0.15 ± 0.02**	0.15 ± 0.023**
СП, %	48.78 ± 10.63	34.5 ± 2.9*	58.38 ± 5.6**	57.67 ± 5.30**
ST ^к , мм	1.4 ± 0.16	-0.42 ± 0.31*	1.0 ± 0.1**	1.0 ± 0.1**

Примітки:

* — відхилення достовірне по відношенню до групи інтактного контролю ($p \leq 0.05$);

** — відхилення достовірне по відношенню до групи контрольної патології ($p \leq 0.05$);

ST^к — відхилення ST від ізоїнії;

n — кількість тварин у групі.

Таблиця 2

Вплив лікарських форм кверцетину на біохімічні показники при адреналіновому міокардиті у щурів

Показник	Умови експерименту			
	Інтактний контроль (n=8)	Контрольна патологія (n=5)	Ліпофлавон, 94 мг/кг (n=7)	Корвітин, 31.5 мг/кг (n=6)
виживання, %	100	62.5	87.5	75
КМС	0.32 ± 0.01	0.39 ± 0.01*	0.35 ± 0.01**	0.36 ± 0.01
<i>Гомогенат міокарду</i>				
ТБК-реактанти, мкмоль/г	27.24 ± 1.91	75.38 ± 5.65*	42.49 ± 2.15 **/**	55.99 ± 4.3 **
G-SH, мкмоль/г	2.15 ± 0.09	1.27 ± 0.13*	2.03 ± 0.14**	1.66 ± 0.1
<i>Сироватка крові</i>				
АсАТ, ммоль/ч-л	0.73 ± 0.02	1.45 ± 0.03*	1.20 ± 0.03**	1.40 ± 0.03
ТБК-реактанти, мкмоль/л	0.54 ± 0.02	1.54 ± 0.08*	0.60 ± 0.04**	1.28 ± 0.11
G-SH, мкмоль/л	4.06 ± 0.17	2.35 ± 0.14*	3.04 ± 0.17**	2.48 ± 0.14

Примітки:

* — відхилення достовірне по відношенню до групи інтактного контролю ($p \leq 0.05$);

** — відхилення достовірне по відношенню до групи контрольної патології ($p \leq 0.05$);

*** — відхилення достовірне по відношенню до групи тварин, лікованих корвітином ($p \leq 0.05$);

n — кількість тварин у групі.

риду спостерігалось підвищення ЧСС, зниження систолічного показника (СП) і скорочувальної функції міокарду (зубець R) у середньому на 30-35 %, що необхідно розцінювати як нестачу скорочувальної активності передсердь внаслідок виснаження міокарду, та зміщення сегмента ST на 30 % від ізолінії (Табл. 1).

Адреналінове ушкодження міокарду супроводжувалося також істотною активацією (у 2.9 рази) процесів ВРО та вичерпанням глутатіонзберігаючої активності (у 1.7 рази), підсиленням кардіоцитолізу (підвищення рівня АсАТ у сироватці крові у 2 рази).

Патологія міокарду характеризувалася розвитком проліферативних та ексудативних процесів у міокарді (збільшення значення КМС в 1.2 рази у групі тварин із контрольною патологією) (Табл. 2).

Застосування Ліпофлаону та Корвітину призвело до зниження кардіотоксичних ефектів великих доз адреналіну: нормалізація ЧСС на 20 %; підвищення систолічного показника на 65 %, зменшення явищ ішемії (зникнення зміщення сегменту ST від ізолінії), покращення на 39 % скорочувальної здатності міокарду (зубець R) (Табл. 1).

Крім того, на тлі внутрішньовенного введення Ліпофлаону і Корвітину відбувалося зменшення інтенсивності процесів ВРО: під дією ЛФК рівень ТБК-реактивних у гомогенаті міокарду достовірно знижувався у 1.8 рази, у сироватці крові — у 2.6 рази порівняно з контрольною патологією; при введенні Корвітину відбулося лише достовірне зниження рівня ТБК-реактивних у гомогенаті міокарду у 1.3 рази (Табл. 2).

На відміну від Корвітину, застосування Ліпофлаону призводило до відновлення глутатіонзберігаючої активності: достовірно зріс рівень G-SH у сироватці крові в 1.3 рази, у гомогенаті міокарду — в 1.6 рази; при введенні водорозчинної парентеральної форми кверцетину спостерігалася лише тенденція (на 5 %) до нормалізації даного показника.

Таким чином, найбільш виражену дію на процеси ВРО виявила ліпосомальна форма кверцетину, що підтверджувалося достовірним зниженням по відношенню до групи тварин, яким вводили водорозчинну форму кверцетину, в 1.3 рази вмісту ТБК-реактивних у гомогенаті міокарду.

При адреналіновому міокардиті найбільш виражену антицитолітичну активність проявила ЛФК, що підтверджувалося зниженням рівня АсАТ у сироватці крові в 1.2 рази

($p \leq 0.05$). Корвітин практично не впливав на цей показник. Введення лікарських форм кверцетину за модельної патології міокарду підвищило виживання тварин та склало: при введенні ЛФК — 87.5 %, водорозчинного кверцетину — 75 %.

Висновки

У ході проведених експериментальних досліджень Ліпофлаон виявив більшу кардіопротекторну активність у порівнянні з Корвітином, не зважаючи на те, що доза кверцетину у ЛФК у 1.3 рази менша, ніж у Корвітині. Даний факт є підтвердженням більшої ефективності Ліпофлаону, що виражається у переважній дії на пригнічення інтенсивності процесів ВРО, цитолізу. Це пояснюється тим, що до складу Ліпофлаону входить лецитин (фосфатиділхолін). За літературними даними відомо, що ліпосоми забезпечують цілеспрямоване потрапляння ліків у міокард, тому здатні зменшувати деструкцію кардіоміоцитів, явища запального процесу в міокарді. Вони підвищують імунорезистентність організму шляхом активації клітин макрофагально-фагоцитарної системи та значно підвищують резистентність організму до гіпоксії [14].

Одержані результати свідчать про доцільність включення Ліпофлаону до схем лікування серцево-судинних захворювань, що супроводжуються розвитком запального процесу, активацією процесів ПОЛ, мембранодеструкцією, зокрема при міокардитах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белік Г.В., Григор'єва Г.С., Деримедвідь Л.В. Особливості кардіопротекторної дії ліпосомальної форми кверцетину на моделі доксорубіцинової кардіоміопатії у щурів // Ліки. - № 5-6. - 2004. - С. 60-63.
2. Вишнева О.П. Ареактивность миокарда белых крыс к повторным инъекциям больших доз адреналина // Бюл. эксперим. биологии - 1954. - № 10. - С. 29-32.
3. Зыков А.А., Головнев В.А., Белкина О.М. Изменения жирнокислотного состава крови и лимфы на фоне действия биофлавоноидов манжетки обыкновенной при инфаркте миокарда // Бюл. СО РАМН. - 2001. - № 4. - С. 63-64.
4. Караванская И.Л., Коваль Е.А. Влияние корвитина (парентеральной формы кверцетина) на функциональное состояние основных популяций лейкоцитов у больных с острым Q-инфарктом миокарда // Український кардіологічний журнал. - 2001. - № 5. - С. 48-53.
5. Ковалёв В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Український медичний альманах. - 1999. - Т. 2, № 4. - С. 176-184.
6. Количественная динамика креатинфосфокиназы при повторном экспериментальном инфаркте миокарда на фоне действия биофлавоноидов / Бородин Ю.И., Гончаров А.Б., Головнев В.А. и др. // Бюл. СО РАМН. - 2001. - № 3. - С. 78-81, 120-121, 124-125.
7. Влияние блокатора 5-липосигеназы кверцетина на функциональные и морфологические проявления пора-

- жения миокарда при ишемии и реперфузии сердца / Колчин Ю.Н., Попович Л.Ф., Грабовський А.Н. и др. // Кардиология. — 1990. — Т. 30, № 3. — С. 72-75.
8. Левицкий А.П. Биофлавоноиды как регуляторы физиологических функций // Вісн. стоматології. - 2001. - № 1. - С. 71-76.
9. Влияние блокатора липоксигеназы кверцетина на нарушение ритма у больных острым инфарктом миокарда / Мойбенко А.А., Колчин Ю.Н., Черноусова В.В. и др. // Український кардіологічний журнал. - 1994. - № 4. - С. 83.
10. Потапович А.И., Костюк В.А. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флавоноидов // Биохимия. - 2003. - Т. 68, № 5. - С. 632-638.
11. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. — 1979. - Т. 247. - № 6. — С. 1513-1516.
12. Симоненко В., Фисун А., Скляр А. Антигипоксанты в лечении острого коронарного синдрома // Врач. - 2001. - № 4. - С. 28-31.
13. Трохимович А.А. Стан антиоксидантної системи та його корекція при коронарних ураженнях серця // Український ревматологічний журнал. - 2001. - № 3-4. - С. 86-88.
14. Черный В.И., Дацко А.А., Килимниченко О.И. Антиоксидантные свойства липина при лечении больных различными заболеваниями // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. - 2002. - № 1. — С. 65-79.
15. Hearse D.J. Myocardial injury during myocardial ischemia end reperfusion: concepts and controversies. - NY: Raven Press, 1992. — 288 p.
16. Bioflavonoids quercetin scavenges superoxide and increase nitric oxide concentration in ischemic-reperfusion injury: an experimental study / Huk I., Brovkovich V., Nanobashvili I. et al. // Br. J. Surg. - 1998. — Vol. 85, No. 8. - P. 1080-1085.
17. Kubler W., Haas M. Cardioprotection: definition, classification and fundamental principles // Heart. - 1996. — No. 75. - P. 330-333.
18. Moibenko A.A., Maхyutina N.P., Parchomenko A.N. Lipoxigenase and NO-sintase activities following acute myocardial infarction, new aspects of treatment // III International Congress of pathophysiology. - Lahti (Finland), 1998. - P. 9-10.
19. Yochimoto T., Furukewe M., Yomamoto S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxigenase // Biochem. Biophysiol. Res. Comm. — 1983. — Vol. 116, No. 2. — P. 612-614.

Резюме

Дроговоз С.М., Григорьева А.С.,
Белик Г.В., Столетов Ю.В.

**Сравнение кардиопротекторных свойств
липосомальной и водорастворимой лекарственных
форм кверцетина**

Проведены исследования кардиопротекторных свойств липосомальной формы кверцетина на модели адреналинового миокардита у крыс. В ходе эксперимента установлено, что липосомальная форма кверцетина, введенная в профилактическом режиме, проявляла выраженное действие на ингибирование процессов СРО, цитолиза, нормализацию уровня восстановленного глутатиона в крови и миокарде и способствовала улучшению метаболических и электрофизиологических процессов в миокарде. Такое действие было более эффективным, чем действие водорастворимой формы кверцетина. Результаты исследований позволяют рекомендовать использование липосомальной формы кверцетина в комплексной терапии миокардитов.

Summary

Drogovoz S.M., Grigoryeva A.S., Belik G.V., Stoletoev Yu.V.

**Comparison of cardioprotective properties of liposomal
and water-soluble quercetin dosage forms**

Studies of cardioprotective properties of quercetin liposomal form at the model of adrenaline myocarditis in rats were conducted. At the experiment it was established, that quercetin liposomal form, which were injected in preventive regimen, showed expressed effect on inhibition of processes of FRO, cytolysis, normalization of a level of reduced glutathione in the blood and in the myocardium, promoted an improvement of metabolic and electrophysiological processes in the myocardium. Such effect of quercetin liposomal form was more effective, than an effect of quercetin water-soluble form. Results of studies allowed recommend the use quercetin liposomal form in myocarditis complex therapy.

Григор'єва Ганна Савівна. Д.х.н. Професор.
Працює в інституті фармакології та токсикології
АМН України.

Белік Галина Володимирівна. Закінчила національну фармацевтичну академію України (1995).
Асистент кафедри фармакології НФаУ.

Дроговоз Світлана Мефодіївна. Зав. кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (НФаУ). Д.мед.н. Професор. Засл. діяч народної освіти України.

Столетов Юрій Віталійович. Закінчив Харківський фармацевтичний інститут. Доцент кафедри фармакології НФаУ.

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 та на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким і присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням одержаних наукових результатів; висновки з даного дослідження та перспективи подальших розвідок у даному напрямку.
2. Стаття має бути надрукована на папері формату А4 через 2 інтервали з полями 2.5 см з усіх боків, 28-30 рядків на сторінці, 60-65 знаків у рядку, розмір шрифту 14, шрифт Times New Roman або Arial.
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, зобра-

ження 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.