

ГОЛОВНА ПОДІЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ГАЛУЗІ



PHARM
Complex

III Міжнародний форум фармацевтичної індустрії

25-27 вересня 2012



КИЇВ ЕКСПО ПЛАЗА
Київ, вул. Салютна, 2-Б (ст. метро «Нивки»)

За підтримки:

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

Організатори:



3-я Міжнародна спеціалізована виставка комплексного забезпечення фармацевтичної промисловості PHARMPROM – 2012

- ❖ **PHARMSOLUTIONS**
комплексні рішення для фармацевтичних компаній: проектування, інжинірингові, технологічні, фінансові рішення
- ❖ **PHARMEQUIPMENT**
виробничі і не виробничі обладнання
- ❖ **PHARMCOLD&CLIMA**
промислове, холодильне та кліматичне обладнання
- ❖ **PHARMLAB&CONTROL**
аналітичне устаткування, контрольно-вимірвальна та регулююча апаратура, лабораторне обладнання
- ❖ **PHARMHR**
навчання та підготовка персоналу
- ❖ **PHARMRAW**
сировина та інгредієнти
- ❖ **PHARMWATER**
технології і устаткування для водопостачання, водопідготовки і очищення стічних вод
- ❖ **PHARMCLEANTECH**
чисті приміщення, клінінг, спецодяг і засоби індивідуального захисту
- ❖ **PHARMPACK**
упаковка і пакувальне обладнання
- ❖ **PHARMSERVICE**
послуги для компаній фармацевтичної галузі



3-я Міжнародна спеціалізована виставка фармацевтичної продукції PHARMEX – 2012



Міжнародна спеціалізована експозиція логістичних технологій для фармацевтичної індустрії PHARMLogistEX – 2012

В РАМКАХ ДІЛОВОЇ ПРОГРАМИ ФОРУМУ:

- III Міжнародна конференція «Дні фармацевтичної промисловості»
- DEMO-ТУР «Сучасна лабораторія у фармацевтичній промисловості»

Партнери:

3 питань участі у виставках:

+38 044 526 92 97 @ pharm@lmt.kiev.ua

WWW.PHARMCOMPLEX.COM

3 питань участі в діловій програмі:

+38 044 361 07 21 @ marketing@lmt.kiev.ua

Генеральний інформаційний партнер: Фармацевтичний Кур'єр

Генеральний інтернет-партнер:

Інформаційні партнери:



Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України

Гризодуб О.І., Левашова О.А., Борщевський Г.І.

Стандартизована процедура валідації методик атомно-абсорбційного кількісного визначення лікарських засобів у варіанті калібрувального графіка 5

Будова та властивості

Ведерникова І.О., Коваль А.О., Фаталієва А.В.

Дослідження намагніченості та розміру наночастинок цинкзаміщеного магнетиту 27

Готові лікарські засоби

Зінченко О.А.

Визначення складу газової фази в ампульованих лікарських засобах 30

Філімонова Н.І., Спиридонов Д.А., Рибалкін М.В.

Дослідження осмотичної активності мазі протимікробної дії для лікування ранового процесу на першій стадії 37

Стандартизація лікарських засобів

Георгієвський Г.В., Мазур І.А.

Будова та критичні показники якості субстанції лізинію 40

Котов А.Г., Леонтьєв Д.А., Леонтьєв Д.Д., Гризодуб О.І.

Розробка методології вибору методу аналізу для ідентифікації харчових барвників 48

Фармакологічні дослідження

Цубанова Н.А., Штриголь С.Ю., Ходаківський О.А.

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на кровопостачання головного мозку, деструкцію нейронів і кислотно-лужний баланс при експериментальній церебральній ішемії 60

Організація діяльності фармацевтичних підприємств

Мнушко З.М., Пестун І.В., Бондарєва І.В.

Сучасні підходи до процесу управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах 64

Аналітичний огляд

Данилов С.А., Товчига О.В., Степанова С.І., Штриголь С.Ю.

Лікарські рослини, що мають седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності, їх біологічно активні речовини та механізми їхньої дії 68

Аналітичне обладнання для фармацевтичної галузі

Прилади для ВЕТШХ, що використовуються при контролі очищення технологічного обладнання 87

-
- Рецензенти: чл.-кор. НАНУ, д.фарм.н., професор Георгієвський В.П.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; д.х.н., професор Литвиненко В.І.; к.фарм.н. Столпер Ю.М.; 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 і медичної продукції», протокол № 9 від 16.11.11.
 - Підписано до друку 26.12.11. Тираж 500 прим.
-

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Гризодуб А.И., Левашова О.Л., Борщевский Г.И.

Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика 5

Строение и свойства

Ведерникова И.А., Коваль А.А., Фаталиева А.В.

Исследование намагниченности и размера наночастиц цинкзамещенного магнетита 27

Готовые лекарственные средства

Зинченко А.А.

Определение состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах 30

Филимонова Н.И., Спиридонов Д.А., Рыбалкин Н.В.

Исследование осмотической активности мази противомикробного действия для лечения раневого процесса на первой стадии 37

Стандартизация лекарственных средств

Георгиевский Г.В., Мазур И.А.

Строение и критические показатели качества субстанции лизиния 40

Котов А.Г., Леонтьев Д.А., Леонтьев Д.Д., Гризодуб А.И.

Разработка методологии выбора метода анализа для идентификации пищевых красителей 48

Фармакологические исследования

Цубанова Н.А., Штрыголь С.Ю., Ходаковский А.А.

Влияние спироциклического производного оксиндола на кровоснабжение головного мозга, деструкцию нейронов и кислотно-щелочной баланс при экспериментальной церебральной ишемии 60

Организация деятельности фармацевтических предприятий

Мнушко З.Н., Пестун И.В., Бонгарева И.В.

Современные подходы к процессу управления изменениями на производственных фармацевтических предприятиях 64

Аналитический обзор

Данилов С.А., Товчига О.В., Степанова С.И., Штрыголь С.Ю.

Лекарственные растения, обладающие седативной, анксиолитической и сопряженными видами фармакологической активности, их биологически активные вещества и механизмы их действия 68

Аналитическое оборудование для фармацевтической отрасли

Приборы для ВЭТСХ, используемые при контроле очистки технологического оборудования 87

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.07

Гризодуб А.И., Левашова О.Л., Борщевский Г.И.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Национальный фармацевтический университет

ОАО «Фармак»

Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика

Проведен критический анализ фармакопейной процедуры валидации методик атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС) и показана ее метрологическая некорректность. Разработана метрологически обоснованная стандартизованная процедура валидации методик количественного определения с помощью ААС в варианте калибровочного графика. Показано, что более надежным является подход, основанный на предположении равенства неопределенностей калибровки и испытуемой пробы. Показано также, что для достаточно узких аналитических диапазонов (не шире (70-130) % от номинального значения) может применяться также и метод стандарта. Разработанная стандартизованная процедура валидации апробирована на ААС-количественном определении железа в мультивитамино-минеральном комплексе *Gesticare*.

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия (ААС) является фармакопейным методом [1] и широко применяется для количественного определения металлов в лекарственных средствах (ЛС). Так, применение ААС является достаточно обычным для контроля калия и железа в готовых лекарственных средствах - аспаркаме [2], таблетках калия глюконата, железа фумарата, железа глюконата и др. [3]. Для витаминов и пищевых добавок Американская Фармакопея (USP) использует ААС как основной метод фармакопейного количественного определения металлов [3].

Как и любая другая фармакопейная методика, методика ААС должна быть валидирована. Рекомендации по проведению валидации методик ААС даны в Государственной Фармакопее Украины (ГФУ) [1], которая гармонизована с Европейской Фармакопеей (ЕФ). Однако их применение на практике вызывает много вопросов. Следует отметить, что в ГФУ описана стандартизованная процедура валидации аналитических методик [4], которая в настоящее время разработана для всех основных фармакопейных методов спектрофотометрии (СФ), ВЭЖХ, ГХ в вариантах количественного определения, контроля сопутствующих примесей, контроля остаточных растворителей методом добавок и основных вариантов титрования [5]. Достаточно подробно разработана специфика валидации методик контроля качества и для экстемпоральных препаратов [6].

Однако для методик ААС до настоящего времени такая стандартизованная процедура

не описана, что создает определенные трудности при проведении валидации методик ААС количественного определения ЛС. В данной работе предпринята попытка провести критический анализ подхода ГФУ-ЕФ и разработать такую процедуру.

1. Подход ГФУ-ЕФ к выполнению и валидации методик ААС

Процедура [1]

Для проведения анализа обычно используют концентрации, которые находятся в пределах линейного диапазона калибровочной кривой. Если это невозможно, можно использовать также криволинейные участки калибровочной кривой после их обработки с помощью подходящей математической программы.

Определение проводят путем сравнения величин поглощения испытуемого раствора и растворов сравнения с известными концентрациями определяемого элемента, методом калибровки (метод 1) или методом стандартных добавок (метод 2).

Метод 1 — Метод калибровки

Для рутинных измерений готовят три раствора сравнения исследуемого элемента и холостой раствор.

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Не менее трех растворов сравнения определяемого элемента готовят так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентрации определяемого элемента в исследуемом

растворе. Для количественных определений оптимальный диапазон калибровки должен находиться между такими значениями, которые в 0.7-1.3 раза превышают значение ожидаемого содержания определяемого элемента или предела, указанного в частной статье. Для испытания на граничное содержание примесей диапазон калибровки должен охватывать предел обнаружения и 1.2 специфицированного предела определяемого элемента. Какие-либо реактивы, которые используются при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют к растворам сравнения и холостому раствору в тех же количествах, что и для испытуемого раствора.

Испытуемый раствор и каждый раствор сравнения вводят в генератор одинаковое количество раз для получения устойчивых значений.

Расчеты. Строят калибровочную кривую зависимости средних значений поглощений растворов сравнения от концентрации и определяют концентрацию элемента по значению поглощения испытуемого раствора на построенной калибровочной кривой.

Метод 2 – Метод стандартных добавок

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинакового объема. Во все колбы, кроме одной, прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы раствора сравнения определяемого элемента и доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки. При этом концентрации полученных растворов, по возможности, должны находиться в линейной области калибровочной кривой.

Каждый из растворов вводят в прибор одинаковое количество раз, каждый раз регистрируют установившееся показание.

Вычисление. Рассчитывают параметры линейной зависимости методом наименьших квадратов, строят калибровочную кривую и по ней находят концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

1.2. Валидация [1]

Линейность

В соответствии с ГФУ-ЕФ [1] готовят и анализируют не менее 4 стандартных растворов в диапазоне калибровки и один холостой раствор. В случае *Метода 1 – Метода калибровки* диапазон для количественного определения должен охватывать (70-130) % от номинального значения. Проводят не менее 5 измерений для каждого раствора.

Параметры калибровочной прямой рассчитывают методом наименьших квадратов,

используя данные всех измерений. Методика анализа считается приемлемой, если:

- коэффициент корреляции превышает 0.99,
- остаточные отклонения (разница между средними экспериментальными значениями для каждого раствора и рассчитанными по калибровочной прямой) распределены вокруг калибровочной прямой случайным образом.

Рассчитывают средние значения и относительные стандартные отклонения (*RSD*) для точек с наибольшей и наименьшей концентрациями калибровочной прямой. Если отношение рассчитанных стандартных отклонений выходит за диапазон 0.5-2.0, для расчета калибровочной прямой используют весовые множители для точек.

Правильность

Для количественного определения исследуют значения введено/найденно в диапазоне концентраций (90-120)%, для следового анализа — в диапазоне (80-120)%.

Сходимость

Должна быть не более 3 % для количественного определения и не более 5% для предельных тестов.

Валидация аналитических методик в USP описана в общей статье <1225> *Validation of compendial procedures* [3], которая гармонизована с соответствующим руководством ICH и поэтому мало чем отличается от общей статьи ГФУ-ЕФ [4]. Каких-либо особых указаний для валидации методик AAC USP не дает.

2. Обсуждение подхода ГФУ-ЕФ

2.1. Методика

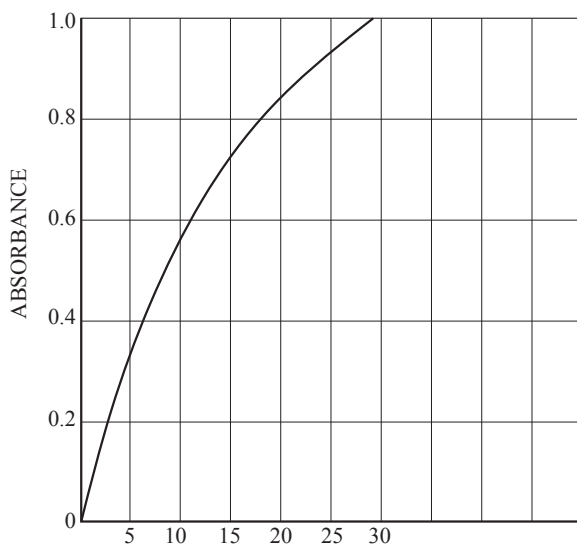
2.1.1. Проблема линейности и выбор методики

Характерной особенностью AAC является то, что, в отличие от абсорбционной спектрофотометрии, для выполнения линейной зависимости абсорбции от концентрации здесь нет теоретических предпосылок, но в воспроизводимых условиях линейность обычно выполняется [3, <851>]. На практике линейность выполняется в достаточно узком диапазоне. Типичный пример зависимости абсорбции от концентрации приведен на Рис. 1.

Как видно, о прямо пропорциональной зависимости (т.е. о прохождении калибровочной прямой через нуль) можно говорить только для области значений абсорбции примерно до 0.25. Кроме того, для разных определяемых элемен-

тов и разных приборов эта область, вообще говоря, может быть различной. В остальных случаях линейная зависимость выполняется для узкого интервала концентраций, но остаточный член не равен нулю.

Рисунок 1



Паспортная зависимость абсорбции от концентрации железа (ppm) для аппарата атомной абсорбции Varian 220 FS Double Beam AA (USA)

Это приводит к тому, что ГФУ-ЕФ, хотя и рекомендует работать в линейном диапазоне калибровочной кривой, но допускает и использование криволинейных участков этой кривой после ее обработки с применением подходящей математической программы [1]. Для других фармакопейных методов (СФ, ВЭЖХ, ГХ, титрование) таких рекомендаций ГФУ-ЕФ не дает.

Такая неопределенность с линейностью приводит к тому, что в европейской части общей статьи ГФУ 2.2.23 [1] метод стандарта хотя и разрешен, но не описан. Описаны только *Метод 1 - Метод калибровки* и *Метод 2 - Метод стандартных добавок*. Это связано, по-видимому, с тем, что исторически метод ААС вначале нашел применение в контроле металлов в сплавах и других объектах с широкими аналитическими диапазонами концентраций. Для этих диапазонов линейность в ААС обычно выполняется плохо, а если и выполняется, то свободный член (отрезок, отсекаемый калибровочной прямой на оси ординат) обычно статистически и практически значим, что делает невозможным применение метода стандарта и, соответственно, использование стандартизированной процедуры валидации [4-5]. Возможно, поэтому в европейскую часть ГФУ и были введены *Методы 1 и 2* [1].

В то же время, аналитические диапазоны при контроле ЛС гораздо уже, чем для контроля сплавов, и здесь в определенных случаях возможно применение метода стандарта. Поэтому USP в общей статье <851> *Spectrophotometry and light-scattering* [3] описывает метод стандарта для ААС как основной, а в монографиях на конкретные ЛС использует как метод стандарта (*Ferrous Fumarate Tablets*), так и метод калибровочного графика (*Ferrous Fumarate and Docusate Sodium Extended-Release Tablets, Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Oral Solution*) [3]. Учитывая это, в национальную часть ГФУ для ААС было введено описание метода стандарта [1].

Отметим, однако, что в ГФУ-ЕФ (а также в USP) отсутствуют критерии применимости метода стандарта для анализа ЛС методом ААС.

В тех случаях, когда ААС-методика вносится в регистрационную документацию (и, соответственно, предполагается ее использование в гослабораториях по контролю качества ЛС, где оборудование может быть более низкого уровня), использование калибровочного графика для анализа ЛС носит более общий характер, чем применение метода стандарта.

Учитывая узкий интервал линейности в ААС, возможность применения *Метода 2 - Метода стандартных добавок* для количественного анализа ЛС вызывает очень большие сомнения. Действительно, если применение метода стандарта или метода калибровочного графика предполагает по ГФУ-ЕФ выполнение линейности в интервале (70-130)% от номинального значения, то применение метода добавок предполагает обязательное выполнение линейности в интервале (70-230)%, что вряд ли возможно с хорошей точностью (Рис. 1). Говорить о применении метода добавок при нелинейной калибровке вообще некорректно, поскольку мы априорно не знаем, на каком участке этой кривой находится испытуемый раствор. Поэтому, в общем случае, применение метода добавок в ААС возможно для контроля примесей (где требуемая точность невелика), но не для количественного определения ЛС.

2.1.2. Метрологическая корректность методик ГФУ-ЕФ

В ГФ-ЕФ указано, что рутинный анализ делается на 3 растворах сравнения, по которым строится калибровочный график. В этом случае число степеней свободы для калибровочной прямой ($Y = a + b \cdot X$) равно $\nu = 3 - 2 = 1$. Односторонний коэффициент Стьюдента для вероятности 0.95 при этом равен 6.31. Говорить о надежности такой калибровочной прямой не

приходится. Учитывая также неопределенность измерений испытуемого раствора, такая методика вряд ли поддается валидации.

Очевидно, что ни о какой криволинейной калибровке по трем точкам не может быть даже и речи, поскольку даже для квадратичной функции ($Y = a + b \cdot X + c \cdot X^2$) число степеней свободы равно нулю.

Отметим, что USP в случае ААС-методик поступает гораздо более корректно. Так, например, для количественного определения железа *Ferrous Fumarate and Docusate Sodium Extended-Release Tablets* используется ААС-методика с построением калибровочного графика по 5 точкам (а не по трем, как рекомендует ГФУ-ЕФ) [3].

2.2. Корректность валидационных критериев ГФУ-ЕФ

2.2.1. Регламентация отношения относительных стандартных отклонений (RSD) для точек с наибольшей и наименьшей концентрациями калибровочной прямой

Это отношение должно быть в интервале 0.5-2.0. В противном случае для расчета калибровочной прямой используют весовые множители для точек, т.е. применяют взвешенный метод наименьших квадратов.

Учитывая, что для обоих RSD число степеней свободы $v_1 = v_2 = 5 - 1 = 4$, используя распределение Фишера [7], можно показать, что интервал 0.5-2.0 соответствует доверительной вероятности 0.90. Однако такая вероятность различия RSD не является статистически значимой. В аналитической практике принято считать, что различие RSD является значимым при вероятности выше 0.95 и высокозначимым при вероятности выше 0.99 [7]. Это соответствует в нашем случае ($v_1 = v_2 = 5 - 1 = 4$) интервалу отношения 0.4-2.5 ($p = 0.95$) и 0.25-4.0 ($p = 0.99$). Таким широким допуском отношения RSD отвечают на практике почти всегда.

Вопрос о регламентации отношения RSD становится еще более запутанным, если учесть, что при построении невзвешенного калибровочного графика используется предположение постоянства абсолютных, а не относительных стандартных отклонений в аналитическом диапазоне (в противном случае необходимо вводить весовые множители). Поскольку этот диапазон охватывает (70-130) % от номинальной концентрации, получим, что даже при точном соблюдении постоянства абсолютных стандартных отклонений, величины RSD для наибольшей и наименьшей концентраций будут отличаться в $130/70 = 1.86$ раза, т.е. почти на пределе тре-

бований (0.5-2.0). Учитывая неизбежные статистические колебания RSD из 5 опытов, выход отношения RSD за пределы 0.5-2.0 является достаточно обычным случаем.

Как видно, регламентация отношения RSD для наибольшей и наименьшей концентраций в пределах 0.5-2.0 является очень спорной.

2.2.2. Использование весовых множителей для построения калибровочной прямой

В этом случае используется взвешенный метод наименьших квадратов (ВМНК). В качестве весов при этом обычно используют величины, обратные соответствующим абсолютным дисперсиям для точек [8]. ВМНК позволяет более точно построить калибровочную прямую (в общем случае кривую). Однако это верно только в том случае, если дисперсии являются генеральными или близкими к ним (т.е. полученными для большого числа точек). В случае 5 измерений (а именно столько рекомендует ГФУ-ЕФ брать для получения дисперсий точек при построении калибровочной прямой в ААС) дисперсии точек в другой серии опытов могут отличаться в 2 раза (что является статистически незначимым по Фишеру на уровне 95 % [7]), и «взвешенная» калибровочная прямая будет совершенно другой, т.е. невоспроизводимой.

Еще более запутанным является вопрос о статистической оценке параметров «взвешенной» калибровочной прямой. Действительно, остаточное стандартное отклонение и коэффициент корреляции такой «взвешенной» прямой не имеют того смысла, который они имеют для обычной «невзвешенной» прямой. Поэтому, например, методика анализа, основанная на «взвешенной» калибровочной прямой с коэффициентом корреляции 0.995, отнюдь не всегда лучше, чем методика, основанная на обычной «невзвешенной» прямой с коэффициентом корреляции 0.99.

Как видно, вопрос о введении весовых множителей является достаточно спорным и неопределенным при проведении валидации.

2.2.3. Требование к коэффициенту корреляции

Из текста методики проведения валидации по ГФУ-ЕФ (п. 1.2) не совсем ясно, сколько же точек обрабатываются с помощью МНК. Действительно выражение «*Параметры калибровочной прямой рассчитывают методом наименьших квадратов, используя данные всех измерений*» можно рассматривать и как то, что обрабатывается $4 \times 5 = 20$ значений ординат против 4 значений абсцисс (концентраций). Такой вариант обработки с помощью МНК является бессмысленным при проверке линейности, поскольку

только маскирует возможную нелинейность и создает видимость увеличения числа степеней свободы. Идя таким путем, можно попытаться (безуспешно) обрабатывать с помощью МНК 20-кратные измерения одной концентрации.

С другой стороны, там же читаем: «Если отношение рассчитанных стандартных отклонений выходит за диапазон 0.5-2.0, для расчета калибровочной прямой используют весовые множители для точек». Разрешение на использование весовых множителей для точек означает, что с помощью МНК обрабатываются всего $n = 4$ значений ординат (средние из 5 измерений) против 4 значений абсцисс (концентраций).

Коэффициент корреляции R_c можно рассчитать из соотношения [7]:

$$R_c^2 = 1 - \frac{SD_{rest}^2}{SD_{Co}^2}, \quad (1)$$

где:

SD_{rest} — остаточное абсолютное стандартное отклонение вокруг точек калибровочной прямой,

SD_{Co} — стандартное отклонение точек калибровочной прямой вокруг среднего (номинального значения).

Величины SD_{rest} и SD_{Co} в формуле (1) можно брать в любых одинаковых единицах. Для оценки корректности коэффициента корреляции их удобно брать в процентах к номинальному значению, что мы и будем делать далее.

Следует отметить, что для узких допусков содержания и широких аналитических диапазонов величины R_c могут превышать 0.999 (например, Табл. 1). Поэтому во многих случаях удобнее использовать не сам коэффициент корреляции R_c , а его квадрат R_c^2 , поскольку он меньше.

Поскольку диапазон составляет (70-130) % от номинального значения, а для построения калибровочного графика берется 4 точки, то целесообразно использовать такие значения: 70 %, 90 %, 110 % и 130 % к номинальному значению. Это соответствует $SD_{Co} = 25.82$ %. Тогда, полагая $R_c = 0.99$, из уравнения (1) можно получить $SD_{rest} = 3.64$ %.

Каждая точка — это анализ одной концентрации. Таким образом, доверительный интервал Δ_{As} для такого единичного анализа равен [7]:

$$\begin{aligned} \Delta_{As} &= t(95\%, n - 2) \times SD_{rest} = \\ &= 2.92 \times 3.64 = 10.6\%, \end{aligned} \quad (2)$$

где $n = 4$ (в соответствии с ГФУ-ЕФ [1]).

Как видно, полученный доверительный интервал для точек калибровочного графика яв-

ляется неприемлемым для проведения анализа, поскольку соответствует допускам содержания $(\pm) 10.6/0.32 = 33.2$ % от номинала [4]. А ведь это еще только неопределенность калибровочного графика. Полагая, что неопределенность испытуемого раствора должна быть, как минимум, не меньше, получим суммарную неопределенность всего анализа $\sqrt{2} \cdot 33.2 = 47.0$ %.

Конечно, такая неопределенность является неприемлемой для фармацевтического анализа. Как видно, требования к коэффициенту корреляции калибровочного графика, которые предъявляет при валидации ГФУ-ЕФ, являются некорректными.

Отметим еще один аспект. Если при валидации берется 4 точки для калибровочной прямой, то для рутинного анализа — 3. Налицо нарушение основного принципа валидации — валидация методики должна проводиться в тех же условиях, что и сама методика.

2.2.4. Требования к остаточным отклонениям вокруг калибровочной прямой

В соответствии с ГФУ-ЕФ эти отклонения должны быть «распределены вокруг калибровочной прямой случайным образом».

Что означает данное требование — непонятно, поскольку у нас всего 4 точки. Поэтому вариантов распределения точек вокруг прямой всего два: 1) три с одной стороны и одна с другой; 2) по две с каждой стороны (понятно, что все четыре точки в принципе не могут находиться с одной стороны прямой, полученной методом наименьших квадратов).

Что понимать в данном случае под «случайным» и «неслучайным» распределением точек? Как видно, данное требование является некорректным при использовании метода наименьших квадратов.

2.2.5. Правильность и сходимость

Количественное определение или анализ следов характеризуется полной неопределенностью анализа, которая включает в себя систематическую погрешность (характеризующую правильность результатов) и случайную составляющую неопределенности, которую характеризует сходимость.

ГФУ-ЕФ не предъявляет каких-либо требований к правильности. Лишь говорится, что для количественного определения *исследуют* значения введено/найденно в диапазоне концентраций (90-120) %, а для следового анализа — в диапазоне (80-120) %. Предполагается, что эти требования должны вырабатываться для каждого конкретного случая. Однако непонятно, как их вырабатывать. Кроме того, непонятно,

зачем исследовать линейность в интервале (70-130) %, если правильность проверяется в более узком интервале.

Более определенно выражены требования к сходимости результатов — она должна быть не более 3 % для количественного определения и не больше 5 % для предельных тестов. По-видимому, имеется в виду доверительный интервал сходимости определения одного образца. Однако, поскольку не предъявляется никаких требований к полной неопределенности анализа (учитывающей, в частности, неопределенность калибровки), то требования к сходимости результатов не позволяют охарактеризовать точность анализа.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что подход ГФУ-ЕФ к валидации методик ААС не позволяет подтвердить, что методика обладает необходимой сходимостью и правильностью, поскольку предлагаемые критерии являются некорректными и недостаточными.

3. Предлагаемые подходы к валидации ААС-методик количественного контроля качества лекарственных средств

Валидация аналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения поставленных задач. Поэтому валидацию надо проводить в тех же условиях, что и саму методику.

Учитывая, что метод калибровочного графика (МКГ) имеет более общий характер, чем метод стандарта (МС), на стадии построения калибровочной прямой целесообразно проверить также возможность использования для анализа вместо МКГ более простого МС. Как показано [1, 4, 5], в том случае, когда свободный член a калибровочной прямой (3а), значительно не отличается от нуля (критерии статистической и практической незначимости описаны ранее [4-5]), то применим метод стандарта. Валидация методик ААС в этом случае, формально, ничем не отличается от других методик, например, спектрофотометрии [4, 5]. Основные принципы валидации ААС-методик в варианте метода стандарта описаны в литературе [4] и изложены в ГФУ [1].

В результате проведения валидации должны быть выработаны также требования к пригодности системы, которые позволяют оценить при рутинном анализе, соответствуют ли текущие условия тем, которые были (или предполагались) при валидации.

3.1. Специфика валидации методик ААС в варианте калибровочного графика

Для методик ААС часто приходится считать-ся с узким интервалом линейного диапазона, а

также с тем, что калибровочная прямая может значимо (статистически или практически [1, 4, 5]) не проходить через начало координат. В этом случае метод стандарта (МС) не применим, и необходимо применять метод калибровочного графика (МКГ). Концентрация анализируемого компонента (C) в испытуемом растворе находится при этом по измеренной абсорбции (A) из уравнения калибровочной прямой, которая может быть записана как через истинные концентрации (C), так и через нормализованные — X (в процентах к номинальной концентрации) и Y (в процентах к номинальной абсорбции):

$$X = b \times Y + a. \quad (3a)$$

$$X = b_1 \times A + a_1. \quad (3b)$$

$$X = b_2 \times A + a_2. \quad (3c)$$

Как уже отмечалось выше, стандартизованная процедура валидации методик контроля качества ЛС [1, 4, 5] разработана именно для МС.

Таким образом, возникает общая задача разработки стандартизованной процедуры валидации методик в МКГ.

В МС проводится параллельное измерение абсорбций испытуемого и стандартного растворов. Данные растворы являются совершенно равноценными, и неопределенность их измерения предполагается одинаковой. Расчет концентрации в испытуемом растворе проводится из простой пропорции. Прогноз полной неопределенности методики проводится, исходя из требований к сходимости результатов конечной аналитической операции и метрологических требований к мерной посуде и весам (неопределенность пробоподготовки).

В МКГ, параллельно испытуемому раствору, проводится измерение абсорбций нескольких стандартных растворов, по которым строится калибровочная прямая (3). Неопределенность определения концентрации испытуемого раствора по уравнению (3) включает в себя неопределенность измерения абсорбции испытуемого раствора и неопределенность самой калибровочной прямой (3). Неопределенность калибровки не прогнозируется (как и в методе стандарта), а прямо рассчитывается из метрологических характеристик калибровочной прямой (3) и связана как с неопределенностью абсорбции калибровочных растворов (включая конечную аналитическую операцию и пробоподготовку), так и с отклонениями от линейности.

В качестве меры оценки неопределенности калибровочной прямой (3) могут быть использованы разные величины, в частности, неопределенности коэффициентов a и b . Однако более корректной оценкой неопределенности кали-

бровки представляется остаточное стандартное отклонение SD_{rest} . Действительно, если калибровочные растворы получены и измерены в тех же условиях, что и испытуемый раствор, то точка, соответствующая испытуемому раствору, принадлежит той же генеральной совокупности, что и калибровочные растворы, и поэтому может быть описана SD_{rest} .

Отметим, что такой же подход применялся и при разработке стандартизованной процедуры валидации методик в варианте метода стандарта [1, 4, 5].

3.2. Количество точек калибровочного графика

Как уже отмечалось выше, особенность применения МКГ состоит в том, что общая неопределенность получаемых результатов определения концентрации аналита (Δ_{As}) зависит не только от неопределенности (с учетом пробоподготовки) получаемого для него аналитического сигнала (в случае ААС – абсорбции), но и от неопределенности самого калибровочного графика. Это означает, что необходимо устанавливать критерии корректности получаемых результатов измерения аналитического сигнала как для аналита, так и для параметров калибровочного графика.

В общем случае, калибровочный график должен строиться каждый раз, вместе с анализом испытуемого раствора (так обычно и поступают в ААС). Те случаи, когда одним и тем же калибровочным графиком можно пользоваться в одной и той же лаборатории в течение нескольких дней (недель, месяцев), должны каждый раз отдельно обосновываться. Такое обоснование, вообще говоря, выходит за рамки валидации методик в МКГ.

Таким образом, в МКГ приходится считаться с необходимостью построения каждый раз калибровочного графика, что существенно удлиняет анализ по сравнению с МС. Поэтому проверка линейности и построение калибровки по 9 точкам (плюс 1 стандарт), как это принято при валидации в МС [1, 4, 5], в ААС в варианте МКГ является нереалистичной на практике.

ГФУ-ЕФ рекомендует использовать для построения калибровочной прямой $n = 4$ точки [1]. Однако в этом случае калибровочная прямая имеет всего $\nu = 4 - 2 = 2$ степени свободы и односторонний коэффициент Стьюдента 2.92 [7]. Повышение числа точек до $n = 5$ позволяет снизить коэффициент Стьюдента до 2.35 [7], что существенно снижает неопределенность калибровочной прямой, а, следовательно, и неопределенность всего анализа. Отметим,

что так поступает и USP в случае ААС-анализа железа в *Ferrous Fumarate and Docusate Sodium Extended-Release Tablets* [3].

3.3. Нормализованные координаты

Требования к валидационным характеристикам проще получать в нормализованных координатах, поскольку в этом случае они не зависят от специфики конкретного объекта, а только от допусков содержания и диапазона [1, 4, 5].

В МС [1, 4, 5] переход в нормализованные координаты осуществляется путем деления концентрации и аналитического сигнала раствора препарата на концентрацию и аналитический сигнал стандартного раствора. В МКГ вместо стандартного раствора может быть использован калибровочный раствор с номинальной концентрацией C_{nom} и соответствующей ему номинальной абсорбцией A_{nom} . В этом случае выражения для нормализованных координат будут иметь тот же вид, что и для МС [1, 4, 5]:

$$\begin{aligned} X_i (\%) &= 100 \times C_i / C_{st}. \quad C_{st} = C_{nom}. \\ Y_i (\%) &= 100 \times A_i / A_{st}. \quad A_{st} = A_{nom}. \\ Z_i (\%) &= 100 \times Y_i / X_i. \end{aligned} \quad (4)$$

Однако применение нормализованных координат в МКГ далеко не так эффективно, как в МС.

Отметим, что сама величина Y нужна только для построения калибровочного графика в наглядных нормализованных координатах. Для получения коэффициента корреляции, диапазона, остаточного стандартного отклонения и требований к правильности и сходимости используется только величина X . Гораздо более важной, по сравнению с Y , для получения валидационных характеристик является степень извлечения RR :

$$RR (\%) = (введено/найдено) \times 100, \quad (5)$$

которая в МС совпадает с величиной $Z_i = 100 \times Y_i / X_i$. Однако нетрудно видеть, что в МКГ $RR_i \neq Z_i$, поскольку в данном случае, в отличие от МС, $A_i \cdot C_{nom} / A_{nom} \neq C_i$ (найдено). Таким образом:

$$\text{Метод стандарта: } Z = RR. \quad (6)$$

$$\text{Метод калибровочного графика: } Z \neq RR. \quad (7)$$

Учитывая (7), в МКГ достаточно использовать только нормализованную величину X , рассчитанную по соотношению (4). Калибровочная прямая (3b) при этом строится в координатах $X - A$, а степень извлечения RR находится из соотношения (5). Однако использование полных нормализованных координат, т.е. построение

прямой (3а) в координатах $X - Y$, позволяет, как будет показано ниже, оценить из одних тех же экспериментальных данных также и применимость гораздо более простого МС для конкретной методики ААС. Поэтому в дальнейшем мы будем использовать полные нормализованные координаты (4) и прямую (3а).

3.4. Диапазон исследования линейности

ГФУ-ЕФ [1] требует, чтобы диапазон для количественного определения охватывал не уже (70-130) % от номинального значения. С учетом того, что данная методика может применяться для контроля растворения, диапазон можно расширить до (50-150) % от номинального значения. Следует отметить, что USP при контроле витаминов и пищевых добавок использует близкие диапазоны калибровочной прямой. Так, в случае *Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Oral Solution* [3] для определения железа строится калибровочная прямая в диапазоне (2.0-8.0) мкг/мл со средним значением 5 мкг/мл. Это соответствует диапазону (40.0-160) % от номинального значения, что близко к (50-150) %.

Отметим, что в некоторых случаях (для узких допусков содержания) можно использовать и «стандартный» [4] диапазон ГФУ-ЕФ — (80-120) %.

С учетом количества точек калибровочного графика $n = 5$, в Табл. 1 приведены рекомендуемые концентрации растворов (в процентах к номинальной концентрации 4 ppm) для построения калибровочной прямой в МКГ для разных аналитических диапазонов, а также соответствующие им стандартные отклонения

SD_{Co} . В Табл. 1 приведены также рекомендуемые концентрации (в процентах к номинальной концентрации 4 ppm) для $n = 9$ модельных растворов, которые используются также в методе стандарта (МС) для проверки линейности, а также соответствующие им стандартные отклонения SD_{Co} .

3.5. Полная неопределенность методики и ее составляющие

Метод ААС в фармакопейном анализе применяется для количественного определения только готовых лекарственных средств (ГЛС). В случае контроля примесей метод ААС применяется и для субстанций, однако в этом случае их анализ ничем формально не отличается от анализа ГЛС. Поэтому дальнейшее рассмотрение проводится только для ГЛС.

Как было показано [1, 4, 5], полная относительная неопределенность определения концентрации Δ_{As} не должна превышать максимально допустимого значения $\max \Delta_{As}$, которое в случае анализа ГЛС находится из соотношения:

$$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B, \quad (8)$$

где:

B — полуширина допусков (полусумма верхнего и нижнего пределов) содержания анализируемого компонента ЛС, в процентах к номинальному содержанию.

Полная неопределенность ААС-анализа Δ_{As} включает несколько составляющих.

Систематическая погрешность Δ_I , вызванная матричными эффектами (т.е. влиянием плацебо). Величина Δ_I характеризует специфичность методики (см. ниже) как для МС, так и для МКГ, и

Таблица 1

Рекомендуемые концентрации растворов (в процентах к номинальной концентрации 4 ppm) для построения калибровочного графика в МКГ, число точек (n) прямой и соответствующее ей число степеней свободы (ν), рекомендуемые концентрации модельных смесей (используемые также для проверки линейности в МС), а также соответствующие им стандартные отклонения SD_{Co}

№	МКГ			Модельные смеси и МС		
	(80-120) %	(70-130) %	(50-150) %	(80-120) %	(70-130) %	(50-150) %
1.	80.0	70.0	50.0	80.0	70.0	50.0
2.	90.0	85.0	75.0	85.0	77.5	62.5
3.	100.0	100.0	100.0	90.0	85.0	75.0
4.	110.0	115.0	125.0	95.0	92.5	87.5
5.	120.0	130.0	150.0	100.0	100.0	100.0
6.				105.0	107.5	112.5
7.				110.0	115.0	125.0
8.				115.0	122.5	137.5
9.				120.0	130.0	150.0
n	5			9		
ν	3			7		
SD_{Co}	15.81	23.72	39.53	13.69	20.54	34.23

должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$, т.е., учитывая (8) [1, 4, 5]:

$$\delta_1 \leq \max \delta_1 = 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.1 \times B. \quad (9)$$

Величина Δ_1 может быть, в принципе, уменьшена до приемлемого уровня изменением процедуры собственно анализа, например, путем введения плацебо в стандартный или калибровочные растворы.

Неопределенность калибровки (Δ_{cal}). Характерной особенностью неопределенности калибровки Δ_{cal} является то, что ее нельзя уменьшить при выполнении собственно анализа, не изменяя процедуры калибровки и/или аналитического диапазона. Источники возникновения неопределенности калибровки Δ_{cal} существенно различаются для МС и МКГ. Величина Δ_{cal} может быть оценена и регламентирована при исследовании линейности (МС [1, 4, 5]) или при построении калибровочной прямой (МКГ).

Случайная составляющая неопределенности, связанная непосредственно с анализом испытуемого раствора (МКГ) или с анализом испытуемого и стандартного растворов (МС). Данная неопределенность включает как неопределенность конечной аналитической операции (измерение абсорбции), так неопределенность пробоподготовки. Последняя при многократных разбавлениях анализируемых растворов может значительно превосходить неопределенность конечной аналитической операции [11]. Нетрудно видеть [7], что в МС данная случайная составляющая неопределенности примерно в $\sqrt{2}$ раз больше, чем в методе калибровочного графика или в методе удельного показателя поглощения. Случайная составляющая может быть уменьшена при выполнении собственно анализа путем увеличения числа параллельных определений (включая навеску).

3.6. Критерии специфичности методики

Критерии специфичности методики одинаковы для МС и МКГ и такие же, как и для метода спектрофотометрии [5]. Абсорбции холостого опыта (A_{blank}) и раствора плацебо ($A_{placebo}$) не должны значимо влиять на принятие решений о качестве анализируемого образца, поэтому их доля в общей абсорбции (A_{nom}) образца номинального состава должна быть незначима по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$, т.е., с учетом (8-9):

$$100 \times (A_{blank} / A_{nom}) \leq \max \delta_1 = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (10)$$

$$100 \times (A_{placebo} / A_{nom}) \leq \max \delta_1 = 0.10 \times B.$$

3.7. Валидационные критерии в методе стандарта

Данный вопрос подробно рассмотрен нами ранее [1, 4, 5]. Характерной особенностью валидации методик в варианте МС является то, что все валидационные характеристики находятся при исследовании линейности на 9 модельных смесях.

В МС неопределенность калибровки Δ_{cal} связана со значимостью (статистической или практической) свободного члена a калибровочной прямой (3а) и имеет систематический характер [1, 4, 7]. Учитывая общие аналитические требования к максимальному нивелированию систематической погрешности, целесообразно требовать, чтобы систематическая погрешность калибровки Δ_{cal} в МС была незначимой по сравнению с максимально допустимой полной неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$, т.е., учитывая (8) [1, 4, 5]:

Метод стандарта:

$$\Delta_{cal} = \delta_2 \leq \max \delta_2 = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.1 \times B. \quad (11)$$

Для номинальной концентрации (т.е. $X = 100\%$) $\Delta_2 = 0$, достигая максимальных значений на границах аналитического диапазона концентраций (X_{min} и X_{max}). Как показано для МС [1, 4, 5], для того, чтобы величина Δ_2 для всех точек аналитического диапазона не превосходила максимально допустимого значения $\max \Delta_2$ из соотношения (10), свободный член a уравнения (3а) должен выдерживать требование, которое для анализа ГЛС имеет вид:

Метод стандарта:

$$a \leq \frac{0.1 \times B}{1 - (X_{min} / 100)}. \quad (12)$$

Характерной особенностью систематической погрешности Δ_2 , связанной с соотношением (12), является ее предсказуемость — она полностью определяется свободным членом a соотношения (3а) и не может быть уменьшена в рамках МС без уменьшения величины a или без сужения аналитического диапазона (т.е. величины X_{min}). Поэтому требование (11) незначимости величины Δ_2 согласуется в МС с обычной аналитической практикой, требующей нивелирования (исключения) систематической погрешности.

Следует отметить, что систематическая погрешность Δ_2 , связанная с соотношением (12), имеет разный знак на концах аналитического диапазона. Поэтому средняя величина коэффициента извлечения RR (5) для модельных смесей, разбросанных по всему диапазону, может быть очень близка к 100% и не иметь значимой

систематической погрешности. Т.е. средняя величина $100 - RR$ для модельных смесей не может обнаружить систематическую погрешность, связанную с неравенством нулю свободного члена a в МС. Ее регламентирует соотношение (12). Средний коэффициент извлечения при анализе модельных смесей с помощью МС не должен иметь значимой систематической погрешности, т.е. для него должно выполняться соотношение (9).

В случае МС критерий (12) проверяется на стадии анализа 9 модельных смесей ($v = 7$, Табл. 1) [1, 4, 5]. Формально он может быть проверен также на стадии построения калибровки по 5 точкам в МКГ. Однако, за счет низкого числа степеней свободы ($v = 3$, Табл. 1), неопределенность свободного члена a при этом настолько велика (см. экспериментальные данные ниже), что проверить критерий (12) становится невозможно.

Поскольку систематическая погрешность в МС является незначимой, то полная неопределенность методики Δ_{As} совпадает со случайной неопределенностью анализа модельных смесей Δ_{sample} , т.е.:

МС:

$$\Delta_{sample} \leq \max \Delta_{sample} \approx \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (13)$$

Учитывая также, что в случае МС $v = 7$ (Табл. 1), получим [7]:

МС:

$$\Delta_{sample} = t(0.95; 7) \times SD_{rest} = 1.89 \times SD_{rest}. \quad (14)$$

Из (13-14) получим требования к остаточному стандартному отклонению SD_{rest} :

МС:

$$SD_{rest} \leq \max \Delta_{As} / 1.89. \quad (15)$$

Подставляя (15) в выражение (1), получим требования к минимальному коэффициенту корреляции прямой, построенной по 9 модельным смесям.

Суммарные требования к валидационным характеристикам МС представлены в Табл. 2.

3.8. Валидационные критерии в методе калибровочного графика

В отличие от МС, в МКГ линейность проверяется не на стадии анализа 9 модельных смесей, а уже на стадии построения калибровочной прямой (по 5 точкам – см. выше). Критерии линейности калибровочной прямой являются одновременно и критериями пригодности системы. При их невыполнении анализ образцов проводить нельзя.

В МКГ неопределенность калибровки Δ_{cal} связана с неопределенностью параметров калибровочного графика. Величина Δ_{cal} связана как с неопределенностью абсорбции калибровочных растворов (случайная составляющая), так и с отклонениями от линейности. Последние

Таблица 2

Валидационные критерии для метода стандарта (анализ 9 модельных смесей)

$B\%$	$\max \Delta_{As} = \max \Delta_{sample} \%$	$\max \Delta_1, \%$	$\max \Delta_2, \%$	$SD_{rest}, \%$	$\min R_c^2$	$\max a, \%$
<i>диапазон (80-120) %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99620	2.50
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99144	3.75
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.98478	5.00
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.97735	6.10
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.96577	7.50
20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.93914	10.0
<i>диапазон (70-130) %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99831	1.67
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99620	2.50
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.99324	3.33
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.98994	4.07
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.98478	5.00
20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.97295	6.67
<i>диапазон (50-150) %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99939	1.00
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99863	1.50
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.99757	2.00
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.99638	2.44
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.99452	3.00
20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.99512	4.00

носят систематический характер для каждой концентрации, но случайный для всей прямой (поскольку обработка прямой проводится методом наименьших квадратов). Поэтому, если калибровочная прямая строится для каждого анализа (а именно такой случай мы и рассматриваем), то можно считать, что неопределенность калибровки в МКГ имеет случайный характер.

Из параметров калибровочного графика в МКГ мы можем оценить для величины Δ_{cal} только ее доверительный интервал с какой-то вероятностью, который формально ничем не отличается от доверительного интервала схожимости для испытуемого раствора. Поэтому требование незначимости величины Δ_{cal} в МКГ может оказаться слишком жестким. Учитывая это, регламентация величины Δ_{cal} в МКГ, в отличие от МС, далеко не так однозначна, и здесь могут быть предложены различные подходы, которые будут рассмотрены ниже.

Одной из особенностей валидации методик в МКГ является то, что здесь нельзя получить вывод о неопределенности методики из результатов исследования только линейности (как это делалось при валидации методик в МС [1, 4, 5]). Результаты исследования линейности калибровочной прямой характеризуют лишь неопределенность калибровки Δ_{cal} и могут быть использованы при формировании критериев пригодности системы.

Полная неопределенность результатов анализа (в частности, модельных смесей) (Δ_{As}) определяется несколькими факторами, среди которых главными являются:

— неопределенность, связанная с калибровочной прямой (Δ_{cal}); она вызвана неопределенностью параметров a и b калибровочной прямой (3а). Характеристикой этой неопределенности является остаточное стандартное отклонение SD_{rest} , которому соответствует доверительный интервал, аналогичный (14) для МС, но с числом степеней свободы $\nu = 3$ (Табл. 1):

$$\Delta_{cal} = t(0.95; 3) \times SD_{rest} = 2.35 \times SD_{rest}. \quad (16)$$

Величина Δ_{cal} характеризует неопределенность калибровки ААС-методики и не должна превосходить предельно допустимое значение $max\Delta_{cal}$.

Из соотношения (16) можно получить аналогичное (15) выражение для SD_{rest} 5-точечной прямой:

$$SD_{rest} = \Delta_{cal} / 2.35. \quad (17)$$

— неопределенность, связанная с самим испытуемым раствором (Δ_{sample}), т.е. неопределен-

ностью измерения его абсорбции A и пробоподготовки. Величина Δ_{sample} может быть найдена в процессе валидации при анализе модельных смесей и расчете их концентраций по калибровочной прямой (3а).

При выполнении требований специфичности (10), величина Δ_{sample} характеризует схожимость результатов (т.е. случайную составляющую неопределенности) ААС-методики.

С учетом этого, полную неопределенность определения концентрации Δ_{As} можно записать в виде [7]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{cal}^2 + \Delta_{sample}^2} \leq \max \Delta_{As}. \quad (18)$$

При проведении анализа только одного образца (в соответствии с методикой) и расчете его концентрации по калибровочной прямой (3а) мы можем оценить только неопределенность калибровки Δ_{cal} (из метрологических характеристик калибровочного графика), фактическая же величина Δ_{sample} нам неизвестна. Она может быть оценена из результатов анализа модельных смесей в процессе проведения валидации.

Таким образом, для корректного проведения валидации нам необходимо предъявлять какие-то критерии приемлемости к соотношению величин Δ_{cal} и Δ_{sample} .

Из соотношения (8) видно, что имеется критерий только для суммарной величины Δ_{As} , поэтому необходимы какие-то исходные допущения (которые должны быть подтверждены экспериментально) для одной из величин — Δ_{cal} или Δ_{sample} . Целесообразно эти допущения предъявить к Δ_{cal} , поскольку эта величина всегда будет найдена при построении калибровки, и поэтому допущения всегда будут проверяться в рамках проверки на пригодность системы.

Для выработки критериев приемлемости величины Δ_{cal} в МКГ можно предложить 2 подхода [10], основанные на разных допущениях.

3.8.1. Подход 1: допущение незначимости неопределенности калибровки

Калибровочная прямая строится на большем количестве растворов, чем анализ испытуемого образца. Поэтому, по аналогии с МС (см. выше), можно предположить, что в МКГ неопределенность калибровки также должна быть незначимой. Такое допущение незначимости неопределенности калибровки находится вполне в русле обычного подхода при валидации методик в МС, и получаемые формулы для критериев совпадают с полученными ранее для МС [1, 4, 5].

В рамках данного допущения, величина Δ_{cal} должна быть незначима по сравнению с пре-

дельно допустимой полной неопределенностью анализа $\max\Delta_A$, т.е., учитывая (8) [1, 4, 5]:

МКГ. Подход 1:

$$\Delta_{cal} \leq \max \Delta_{cal} = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (19)$$

Данное соотношение совпадает с требованием (11) МС. Из уравнений (17-19) получим требования к остаточному стандартному отклонению SD_{rest} калибровочной прямой:

$$\begin{aligned} SD_{rest} \leq \max SD_{rest} &= \max \Delta_{cal} / 2.35 = \\ &= 0.10 \times B / 2.35 = 0.0435 \times B. \end{aligned} \quad (20)$$

Из соотношений (1, 20) найдем требования к $\min R^2$ или $\min R$ в *Погхоге 1*.

Преимуществом *Погхога 1* является то, что в этом случае неопределенность калибровки можно не учитывать в полной неопределенности анализа Δ_{As} , которая, в соответствии с (18-19), сводится только к Δ_{sample} , т.е., учитывая (8):

$$\Delta_{sample} \leq \max \Delta_{sample} \approx \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (21)$$

Это существенно упрощает оценку результатов проведения валидации. Кроме того, *Погхог 1* всю допустимую неопределенность анализа переносит на испытуемый образец, что делает требования к анализу более либеральными.

Недостатком *Погхога 1* является то, что он предъявляет достаточно жесткие требования (20) к калибровочной прямой, которые не всегда могут быть реализованы на практике. Это связано, в частности, и с малым числом степеней свободы прямой ($\nu = 3$), что приводит к большому (2.35) коэффициенту Стьюдента в уравнении (16).

3.8.2. Погхог 2: неопределенность калибровки равна неопределенности анализа образца

В том случае, когда неопределенность калибровки является значимой, т.е. соотношения (19-20) не выполняются (или могут не выполняться), необходимо сделать какие-то допущения о соотношении неопределенностей калибровки Δ_{cal} и сходимости результатов испытуемого образца Δ_{sample} в полной неопределенности анализа Δ_{As} . Поскольку точность анализа калибровочных растворов и испытуемого раствора является примерно одинаковой, то можно предположить, что их максимально допустимые неопределенности равны, т.е.

$$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample}. \quad (22)$$

В этом случае из соотношений (18, 22) получим:

$$\begin{aligned} \max \Delta_{As} &\leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{cal} = \\ &= \sqrt{2} \times \max \Delta_{sample}. \end{aligned} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \max \Delta_{cal} &= \max \Delta_{sample} \leq \\ &\leq 0.707 \times \max \Delta_{As} = 0.226 \times B. \end{aligned}$$

Тогда из уравнений (17, 23) получим требования к остаточному стандартному отклонению калибровочной прямой SD_{rest} :

$$\begin{aligned} SD_{rest} &\leq \max SD_{rest} = \\ &= \max \Delta_{cal} / 2.35 = 0.0961 \times B. \end{aligned} \quad (24)$$

Подставляя (24) в (1), получим требования к коэффициенту корреляции в рамках *Погхога 2*.

Погхог 2 предъявляет значительно более либеральные требования (24) к остаточному стандартному отклонению SD_{rest} и коэффициенту корреляции R_c калибровочной прямой (3а) по сравнению с *Погхогом 1* (20). Действительно, из сравнения соотношений (18-19) и (23-24) видно, что в *Погхоге 2* допустимое остаточное стандартное отклонение SD_{rest} в 2.26 раза больше, чем в *Погхоге 1*.

Критические значения сходимости испытуемого образца $\max\Delta_{sample}$, остаточного стандартного отклонения $\max SD_{rest}$ и коэффициента корреляции $\min R_c$ для разных диапазонов, допусков содержания и подходов представлены в Табл. 3. Они основаны на соотношениях (1), (8), (9), (19-24) и Табл. 1.

Из Табл. 3 видно, что требования к квадрату коэффициента корреляции R_c^2 зависят от диапазона и допусков содержания и для фармакопейного диапазона (70-130) % во всех случаях превосходят 0.997. Поэтому требования ГФУ-ЕФ к коэффициенту корреляции (> 0.99 , т.е. $R_c^2 > 0.98$) [1] являются явно недостаточными.

3.9. Критерии оценки правильности и прецизионности (сходимости) результатов анализа модельных смесей

3.9.1. Систематическая погрешность

Как уже отмечалась выше, систематическая погрешность (которая характеризует правильность) имеет две составляющие.

Систематическая погрешность первого типа δ_1 связана с матричными эффектами (эффектами плацебо) и проверяется на стадии проверки специфичности методики. Данный тип систематической погрешности примерно одинаков для всех концентраций диапазона и, в соответствии с (9-10), должен быть незначим. Как уже отмечалось в п. 3.5, величина δ_1 может быть, в принципе, уменьшена до приемлемого уровня при выполнении собственно анализа, например, путем введения плацебо в стандартный или калибровочный растворы.

Если требование (10) выполняется при проверке специфичности методики, то при анализе модельных смесей систематическая погрешность для среднего значения коэффици-

ента извлечения RR также должна быть также незначимой, т.е.:

$$\left| \overline{RR - 100} \right| \leq \max \delta_1 = 0.1 \times B. \quad (25)$$

Систематическая погрешность второго типа δ_2 связана с погрешностью калибровки, может существенно различаться для разных концентраций и является принципиально неустранимой, хотя и имеет разную природу в МС и МКГ.

В МС величина δ_2 связана со значимостью свободного члена a прямой (3а) [1, 4, 5]. Критерии незначимости величины δ_2 даются соотношениями (11-12).

В МКГ величина δ_2 связана с отклонениями от линейности и является частью неопределенности калибровки Δ_{cal} , которая характеризуется остаточным стандартным отклонением SD_{rest} и соответствующим ему доверительным интервалом (16). Поскольку калибровочная прямая находится методом наименьших квадратов, то фактические отклонения от нее имеют разную величину и знак для разных концентраций. Поэтому, вообще говоря, экспериментальную систематическую погрешность δ_2 необходимо было бы определять для каждого узкого интервала концентраций, что практически мало выполнимо. Поскольку модельные растворы

охватывают всю область концентраций в рамках аналитического диапазона, то систематическая погрешность для них при сложении должна в значительной степени компенсироваться. Поэтому среднее значение коэффициента извлечения RR (5) для этих растворов не должно иметь значимой систематической погрешности δ_2 . Результаты анализа модельных смесей с помощью МС должны отвечать требованиям Табл. 2.

Учитывая также незначимость систематической погрешности δ_1 , нетрудно видеть, что и для МС, и для МКГ должно выполняться требование (25) незначимости систематической погрешности δ для среднего по всем модельным растворам коэффициента извлечения RR (5). Данное требование обеспечивается требованием специфичности (10), требованием (12) в МС, требованиями (20) (Подход 1) и (24) (Подход 2) в МКГ, которые проверяются при валидации и должны соответствовать Табл. 3.

3.9.2. Прецизионность (сходимость) результатов

В МС и Подходе 1 МКГ неопределенность калибровки Δ_{cal} является незначимой, поэтому при анализе модельных смесей полная неопределенность анализа Δ_{As} связана с неопределенностью анализа собственно образца Δ_{sample} .

Таблица 3

Критические значения валидационных характеристик линейности для разных допусков ($B\%$), диапазонов и подходов в методе калибровочного графика (МКГ) на стадии калибровки

$B\%$	$\max \Delta_{As}$	$\max \Delta_{Is}, \%$	Подход 1 МКГ			Подход 2 МКГ		
			$\max \Delta_{sample}$	$SD_{rest} \%$	$\min R_c^2$	$\max \Delta_{sample}$	$SD_{rest} \%$	$\min R_c^2$
диапазон (80-120) %								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99981	1.13	0.48	0.99908
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99957	1.70	0.72	0.99792
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99924	2.26	0.96	0.99631
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99887	2.76	1.17	0.99450
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99830	3.39	1.44	0.99169
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99697	4.53	1.92	0.98522
диапазон (70-130) %								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99992	1.13	0.48	0.99959
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99981	1.70	0.72	0.99908
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99966	2.26	0.96	0.99836
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99950	2.76	1.17	0.99756
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99924	3.39	1.44	0.99631
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99865	4.53	1.92	0.99343
диапазон (50-150) %								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99997	1.13	0.48	0.99985
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99993	1.70	0.72	0.99967
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99988	2.26	0.96	0.99941
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99982	2.76	1.17	0.99912
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99973	3.39	1.44	0.99867
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99952	4.53	1.92	0.99764

В общем случае, неопределенность (Δ_{sample}) сходимости единичного результата коэффициента извлечения RR для $n = 9$ модельных растворов не должна превосходить максимально допустимую полную неопределенность анализа $\max \Delta_{As}$, т.е. с учетом (8):

Метод стандарта и Погхог 1:

$$\begin{aligned} \Delta_{sample} &= t(95\%, n-1) \times SD_{RR} = \\ &= 1.86 \times SD_{RR} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B, \end{aligned} \quad (26)$$

где:

SD_{RR} — стандартное отклонение степени извлечения RR (5).

В случае *Погхога 2* МКГ имеется значимая неопределенность калибровки Δ_{cal} и требования к сходимости коэффициента извлечения RR , в соответствии с (23), более жесткие:

Погхог 2:

$$\begin{aligned} \Delta_{sample} &= 1.86 \times SD_{RR} \leq \\ &\leq 0.707 \times \max \Delta_{As} = 0.226 \times B. \end{aligned} \quad (27)$$

3.10. Критерии пригодности системы

Задача теста на пригодность системы — удостовериться, что метрологические характеристики системы отвечают тем, которые были получены при валидации.

Пригодность калибровочного графика. В случае МКГ это означает, что метрологические характеристики калибровочного графика (остаточное стандартное отклонение SD_{rest} и коэффициент корреляции R_c) и сходимость повторных измерений аналитического сигнала (абсорбции) $\Delta_{A,r}$ должны отвечать требованиям пригодности системы.

В случае МС единственной экспериментально наблюдаемой метрологической величиной является сходимость повторных измерений абсорбции $\Delta_{A,r}$ для испытуемого и стандартного растворов.

В случае МКГ пригодность системы для величин SD_{rest} и R_c означает, что они должны удовлетворять требованиям корректности линейности (Табл. 3).

Более сложная ситуация с контролем сходимости параллельных измерений абсорбции ($\Delta_{A,r}$). В спектрофотометрии в УФ и видимой части спектра основную часть полной неопределенности анализа составляет неопределенность пробоподготовки и калибровки. При этом сходимость аналитического сигнала $\Delta_{A,r}$ обычно является незначимой по сравнению с полной неопределенностью анализа (см. 2.2.25. *Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях* [9]). Можно пред-

положить, что такая же ситуация и для измерения абсорбции в случае метода ААС. Учитывая принцип незначимости [5] и требования (9) к полной неопределенности анализа, получим требования к относительной неопределенности сходимости параллельных измерений абсорбции $\Delta_{A,r}$:

$$\Delta_{A,r} \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (28)$$

Учитывая, что [7]

$$\Delta_{A,r} = t(95\%, n-1) \times SD_{A,r} / \sqrt{n} \quad (29)$$

из соотношений (28-29) можно получить требования к относительному стандартному отклонению повторных измерений абсорбции $SD_{A,r}$ в зависимости от числа n параллельных измерений:

$$\begin{aligned} SD_{A,r} &\leq \max SD_{A,r} = \\ &= 0.10 \times B \times \sqrt{n} / t(95\%, n-1). \end{aligned} \quad (30)$$

Значения $\max SD_{A,r}$ в зависимости от числа n параллельных измерений и допусков содержания B , рассчитанные по соотношению (30), представлены в Табл. 4.

В том случае, если требования Табл. 4 для данного числа n не выполняются, необходимо увеличить n .

3.11. Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

Данные величины не требуются при проведении валидации методик количественного определения, но они полезны как информация о том, насколько диапазон применения методики превосходит ее предельные возможности («запас прочности» методики). В случае контроля примесей нахождение величин *ПО* и *ПКО* является обязательным [4, 5].

В соответствии с ГФУ [4, 5], *ПО* и *ПКО* могут быть рассчитаны из стандартного отклонения s_a свободного члена линейной зависимости $A = b \times X + a$ и ее угла наклона b . Деление на угол наклона необходимо для перевода абсорбции в концентрацию. Однако в случае соотношения (3а) такого перевода делать уже не надо. Поэтому для него *ПО* и *ПКО* можно рассчитать из следующих соотношений с критериями, которые были получены ранее [5]:

$$ПО = 3.3 \times s_a \leq 32\%. \quad (31)$$

$$ПКО = 10 \times s_a \leq 32\%. \quad (32)$$

Величина *ПО* рассчитывается в этом случае в процентах к предельно допустимому содержанию примесей ImL , а *ПКО* — в процентах к номинальному содержанию [5].

Величины *ПО* и *ПКО* рассчитывают из параметров прямой, построенной по 9 модельным смесям [1, 4, 5]. В принципе, *ПО* и *ПКО* можно рассчитывать и из параметров калибровочной прямой, построенной по 5 точкам. Однако, из-за малого числа степеней свободы ($\nu = 3$) величины *ПО* и *ПКО* в этом случае являются слишком ненадежными.

3.12. Внутрिलाбораторная прецизионность

Внутрिलाбораторная прецизионность характеризует влияние на анализ внутрिलाбораторных факторов: разные – дни, аналитики, оборудование и др. При проверке внутрिलाбораторной прецизионности целесообразно проверить:

- 1) воспроизводимость разработанных параметров пригодности системы, т.е. приемлемость остаточного стандартного отклонения SD_{rest} , коэффициента корреляции R_c (Табл. 3) и SD_{Ar} сходимости параллельных измерений абсорбции (Табл. 4);
- 2) воспроизводимость находимых значений концентрации.

Если в случае проверки пригодности системы ситуация достаточно однозначна (должны выполняться критерии пригодности), то для проверки воспроизводимости находимых значений концентрации могут быть предложены разные подходы. Например, приготовить три смеси состава, близкого к номинальному, и проанализировать их в два разных дня. Различие между средней (по трем смесям) степенью извлечения в два разных дня ($RR(1)$ и $RR(2)$) должно быть практически [1, 4, 5] незначимым, т.е. [7]:

$$|RR(2) - RR(1)| \leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{As} / \sqrt{3} = \sqrt{2/3} \times 0.32 \times B = 0.26 \times B. \quad (33)$$

Кроме того, для каждого дня должны выполняться требования пригодности системы.

Экспериментальная часть

4. Валидация методики определения железа в препарате Gesticare методом ААС в варианте калибровочного графика

Двухфазные таблетки *Gesticare* – специализированный мультивитаминно-минеральный комплекс (МВМК), предназначенный для применения женщинами в течение беременности и послеродового периода, который уменьшает проявления токсикоза и защищает от стрессов, способствует снижению риска преждевременных родов, врожденных уродств и коронарной болезни сердца.

Gesticare содержит в своем составе (на одну таблетку) комплекс витаминов: В1 ((2.7-4.05) мг), В2 ((2.7-3.9) мг), В3 ((18-23.4) мг), В6 ((42-62.5) мг), В9 - фолиевая кислота ((0.9-1.35) мг), В12 ((7.2-10.4) мкг), витамин С ((108-144) мг), Д3 ((378-693) МЕ), Е ((27-36.6) МЕ), а также микроэлементы: кальций ((180-230) мг), железо ((25.2-32.2) мг), цинк ((13.5-17.25) мг), йод ((135-172.5) мкг). В качестве вспомогательных веществ используются натрий карбоксиметилцеллюлоза, магния стеарат, кремния диоксид, СМСС, компоненты для покрытия и полировки.

Стояла задача валидировать ААС-методику количественного определения железа (в виде железа фумарата) в данном препарате в варианте метода калибровочного графика, которая была бы пригодна также и для проведения теста «Растворение».

Оборудование. Аппарат атомной абсорбции Varian 220 FS Double Beam AA (USA). Для стандартизации метода был получен и исследован атомный спектр поглощения при длине волны 248.3 нм в воздушно – ацетиленовом пламени. Паспортная зависимость абсорбции от концентрации железа при 248.3 нм представлена на Рис. 1.

Для каждого раствора проводили по 5 измерений абсорбции.

Таблица 4

Зависимость $\max SD_{Ar}$ от числа n параллельных измерений абсорбции и допусков содержания B для МКГ и МС

$n =$	3	4	5	6	7	8	9
$t(95\%, n-1) =$	2.92	2.35	2.13	2.02	1.94	1.89	1.86
$B\% \downarrow$	значения $\max SD_{Ar} \%$						
5.0	0.30	0.42	0.52	0.61	0.68	0.75	0.81
7.5	0.44	0.64	0.79	0.91	1.02	1.12	1.21
10.0	0.59	0.85	1.05	1.22	1.36	1.49	1.61
12.2	0.72	1.04	1.28	1.48	1.66	1.82	1.97
15.0	0.89	1.27	1.57	1.82	2.04	2.24	2.42
20.0	1.19	1.70	2.10	2.43	2.72	2.99	3.23

Используемые реактивы и стандартные образцы (растворы) отвечали требованиям USP33-NF28 [3].

Пробоподготовка раствора образца (таблеток *Gesticare*). Тонко измельчают 10 таблеток. 5 г (точная навеска) образца помещают в тигель, который нагревают на плите до обугливания. Затем помещают тигель в муфельную печь и сжигают образец при температуре $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Охлаждают и количественно переносят в лабораторный стакан вместимостью 200 мл. Для этого прибавляют в тигель, по каплям, 20 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят до кипения, охлаждают и переносят жидкость в стакан. Промывают тигель водой и промывные воды помещают в тот же стакан.

Кипятят содержимое стакана в течение 30 мин. Охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл. Стакан промывают 6 М раствором хлористоводородной кислоты, промывные воды помещают в ту же мерную колбу, и доводят до метки водой. Раствор в колбе перемешивают и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 10 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят 0.1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки.

Диапазон калибровки. Учитывая, что методика должна быть пригодна как для количественного определения железа, так и для теста «Растворение», диапазон калибровки брали (50-150) % от номинального значения или (2-6) ppm. Это соответствует диапазону абсорбций 0.05-0.14 (Табл. 3), что находится в области линейности (Рис. 1). Количество калибровочных растворов $n = 5$.

Приготовление калибровочных растворов. В соответствии с (6), для диапазона (50-150) % готовят калибровочные растворы с концентрациями 50.0 %, 75.0 %, 100.0 %, 125.0 %, 150.0 % от номинального содержания. Им соответствует $SD_{Co} = 39.53\%$. Для этого 10.0 мл стандартного раствора железа 1000 ppm помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят 0.1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки. 2.0 мл, 3.0 мл, 4.0 мл, 5.0 мл и 6.0 мл полученного раствора помещают в пять мерных колб вместимостью 100 мл и доводят 0.1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки.

Полученные калибровочные растворы имели концентрации $C_{st,i} = 2.0$ ppm (50.0 %), 3.0 ppm (75.0 %), 4.0 ppm (100.0 %), 5.0 ppm (125.0 %) и 6.0 ppm (150.0 %). Номинальная концентрация железа $C_{nom} = 4$ ppm.

Приготовление модельных растворов. 404.3 мг железа фумарата и 5.0018 г плацебо (все компоненты препарата, кроме железа) взвешивали в тигель и далее поступали, как описано выше для пробоподготовки образца. Таким образом готовили 9 модельных смесей с целевым содержанием железа 50.0 %, 62.5 %, 75.0 %, 87.5 %, 100.0 %, 112.5 %, 125.0 %, 137.5 % и 150.0 % (Табл. 1) от номинального содержания в таблетке (28.7 мг). Фактические концентрации железа в модельных растворах представлены в Табл. 8.

4.1. Проверка специфичности

Результаты проверки специфичности в соответствии с валидационными критериями (10) представлены в Табл. 5. Для перевода в нормализованные координаты и оценки специфичности по соотношению (10) за стандарт приняли раствор с номинальной концентрацией $C_{st} = 4$ ppm, для которого $A_{st} = A_{nom} = 0.0955$ (Табл. 6).

Как видно, для абсорбции растворов плацебо и холостого опыта выполняются требования незначимости (≤ 1.22), т.е. методику можно считать специфичной.

4.2. Проверка линейности

Результаты анализа калибровочных растворов приведены в Табл. 6. В ней также приведены нормализованные координаты, рассчитанные по соотношениям (4). В качестве стандарта использовали калибровочный раствор с номинальной концентрацией $C_{st} = 4.0$ ppm, $A_{st} = 0.0955$.

Как видно, для всех растворов выполняются требования пригодности системы к стандартному отклонению ($SD_{A,r} \leq 1.28\%$, Табл. 4).

Строили линейную зависимость (3а) X от Y . Результаты расчетов методом наименьших квадратов [7] представлены в Табл. 7 (критерии — Табл. 3), калибровочный график — на Рис. 2.

Из Табл. 7 видно, что требования Табл. 3 к квадрату коэффициента корреляции R_c^2 и оста-

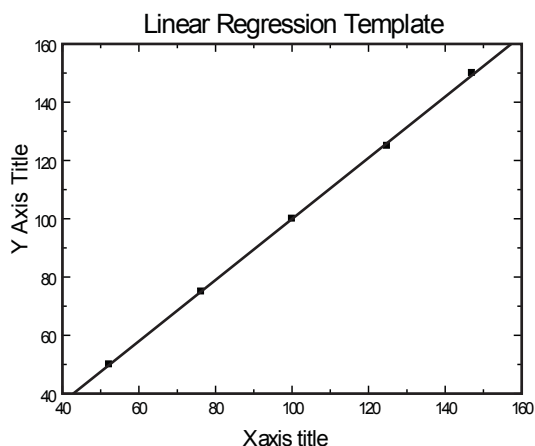
Таблица 5

Результаты измерения абсорбции раствора плацебо и холостого опыта

Название раствора	Значения абсорбции						В % к $A_{nom} = 0.0955$	Критерий %
	1	2	3	4	5	среднее		
раствор плацебо	0.0009	-0.0003	0.0003	0.0007	0.0012	0.0006	0.59	≤ 1.22
холостой опыт	0.0006	-0.0005	-0.0001	-0.0005	0.0002	-0.0003	0.06	≤ 1.22

точному стандартному отклонению SD_{rest} для метода калибровочного графика (МКГ) не выполняются в случае *Подхода 1* для диапазона (D) (50-150) %. Для *Подхода 2*, критерии которого гораздо мягче, требования выполняются для всех трех диапазонов.

Рисунок 2



Калибровочный график зависимости X от Y

4.4. Анализ модельных смесей

Результаты измерения абсорбций модельных смесей и расчета нормализованных величин представлены в Табл. 8. Для расчета нормализованных координат в качестве стандарта использовали калибровочный раствор с но-

минальной концентрацией $C_{st} = 4$ ppm, $A_{st} = 0.0955$ (Табл. 8).

Как видно, для всех растворов выполняются требования пригодности системы к стандартному отклонению ($SD_{A,r} \leq 1.28$ %, Табл. 4).

В соответствии со стандартной процедурой, разработанной для валидации методик в варианте метода стандарта (МС) [1, 4, 5], строили линейную зависимость X от Y (3а). Метрологические характеристики ее представлены в Табл. 9. Критерии для МС взяты из Табл. 2.

Из Табл. 9 видно, что метод стандарта (МС) применим для диапазонов (80-120) % и (70-130) %. Для диапазона (50-150) % МС не применим, поскольку дает значимую систематическую погрешность за счет свободного члена a . Следует отметить, что для валидации ААС и построения калибровочной прямой ГФУ-ЕФ рекомендует диапазон (70-30) % [1].

Полученные величины X и Y (Табл. 8) и калибровочную прямую (Табл. 9) использовали для расчетов по МКГ и МС. Рассчитывали также отклонение каждой точки от истинного значения. Результаты представлены в Табл. 10.

Как видно из Табл. 10, выдерживаются требования (32) к систематической погрешности δ и случайной неопределенности испытуемого образца Δ_{sample} — и для метода стандарта, и для метода калибровочного графика в вариантах как *Подхода 1*, так и *Подхода 2*. При этом не-

Таблица 6

Результаты параллельных измерений абсорбций калибровочных растворов

C ppm	X %	Значения абсорбции, $A \times 10^4$						Y%	$SD_{A,r} \leq 1.28$ %	Вывод
		1	2	3	4	5	среднее			
2.0	50	499	493	502	501	498	499	52.2	0.70	соот.
3.0	75	729	731	723	737	722	728	76.2	0.84	соот.
4.0	100	962	959	951	956	949	955	100.0	0.57	соот.
5.0	125	1190	1194	1190	1195	1195	1193	124.8	0.22	соот.
6.0	150	1406	1396	1412	1403	1407	1405	147.0	0.42	соот.

Таблица 7

Метрологические характеристики калибровочной прямой (3а) $X\% = b \cdot Y(\%) + a$

Параметр	Значение	Метод калибровочного графика			
		подход 1		подход 2	
		критерий	вывод	критерий	вывод
a	-4.95				
s_a	1.02				
b	1.049				
s_b	0.0096				
SD_{rest}	0.725	≤ 0.53	нет	≤ 1.17	соот.
R_c^2	0.99966				
D (80-120) %		≥ 0.99887	соот.	≥ 0.99450	соот.
D (70-130) %		≥ 0.99950	соот.	≥ 0.99756	соот.
D (50-150) %		≥ 0.99982	нет	≥ 0.99912	соот.

значимость систематической погрешности δ действительно связана с тем, что величина $RR-100\%$ имеет разный знак на краях аналитического диапазона и взаимно компенсируется при суммировании. Реальная систематическая погрешность на краях диапазона гораздо выше, и данные Табл. 10 должны обязательно рассматриваться вместе с результатами Табл. 9.

Учитывая результаты Табл. 9 (выполнение требований к свободному члену a линейной зависимости (3а)), МС стандарта применим только для диапазонов (80-120) % и (70-130) %.

Поскольку в *Погхоге 1* не выполняются требования к остаточному стандартному отклонению SD_{rest} (Табл. 7) калибровочной прямой, поэтому *Погхог 1* не применим для всех трех диапазонов. В то же время *Погхог 2* применим для МКГ для всех трех диапазонов.

4.5. Внутривлабораторная прецизионность

В два разных дня готовили и анализировали по 3 модельные смеси состава, близкого к но-

минальному. Каждый раз заново строили калибровочные прямые. Результаты измерения абсорбции модельных и калибровочных растворов приведены в Табл. 11. В ней приведены также рассчитанные по соотношению (4) нормализованные величины X и Y . Для этого использовали $C_{st} = 4$ ppm и величины $A_{st} = 0.0986$ (1 день) и 0.0999 (2 день).

Как видно, во всех случаях выполняются требование пригодности системы – величины $SD_{A,r}$ во всех случаях меньше критического значения 1.28 %.

Метрологические характеристики калибровочных прямых приведены в Табл. 12.

Как видно, в рамках *Погхога 1* критерии выдерживаются только для диапазона (80-120) %. Для *Погхога 2* критерии выдерживаются для всех трех диапазонов. Таким образом, критерии пригодности системы выдерживаются для *Погхога 2*.

Результаты расчета концентраций модельных растворов приведены в Табл. 13.

Таблица 8

Концентрации и абсорбции модельных растворов

С мг/л	Х%	Параллельные измерения $A \times 10^4$						Y%	$SD_{A,r} \leq 1.28\%$	Вывод
		1	2	3	4	5	среднее			
2.038	50.95	502	500	496	497	498	499	52.19	0.48	соот.
2.521	63.03	609	613	610	610	611	611	63.91	0.25	соот.
3.031	75.78	720	733	728	734	729	729	76.28	0.76	соот.
3.565	89.13	848	851	861	844	859	853	89.24	0.85	соот.
4.058	101.45	969	962	971	966	965	967	101.17	0.36	соот.
4.516	112.90	1075	1080	1067	1069	1073	1073	112.29	0.48	соот.
5.016	125.40	1192	1189	1189	1190	1184	1189	124.43	0.25	соот.
5.434	135.85	1289	1288	1278	1282	1290	1286	134.54	0.40	соот.
5.875	146.88	1387	1396	1381	1382	1393	1388	145.26	0.48	соот.

Таблица 9

Метрологические характеристики прямой (3а) $X\% = b \times Y(\%) + a$ для модельных растворов

Параметр	Значение	Метод стандарта	
		критерий	вывод
a	-2.85		
D (80-120) %		$ a \leq 6.1$	соотв.
D (70-130) %		$ a \leq 4.1$	соотв.
D (50-150) %		$ a \leq 2.4$	нет
s_a	0.01		
b	1.031		
S_b	0.0001		
SD_{rest}	0.010	≤ 2.06	соотв.
R_c^2	1.00000		
D (80-120) %		≥ 0.97735	соотв.
D (70-130) %		≥ 0.98994	соотв.
D (50-150) %		≥ 0.99638	соотв.
ПО%	0.33	32	соотв.
ПКО%	1.15	32	соотв.

Из Табл. 13 видно, что требования (33) к внутрилабораторной прецизионности выдерживаются как для МКГ, так и для МС.

Суммируя результаты Табл. 11-13, можно сделать вывод, что требования к сходимости абсорбции (Табл. 11) выдерживаются во всех

случаях для всех диапазонов как для МКГ, так и для МС. Требования пригодности системы – пригодность калибровки (Табл. 12) - выдерживаются для МКГ для всех трех диапазонов только в случае *Подхода 2*. При этом для *Подхода 1* требования выдерживаются только для диа-

Таблица 10

Результаты анализа модельных смесей с использованием метода стандарта (МС) и метода калибровочного графика (МКГ)

X%	Y%	МС		МКГ		
		$Z = 100 \times (Y/X) = RR\%$	$RR-100\%$	$X_{calc}\%$	$RR\%$	$RR-100\%$
50.95	52.19	102.43	2.43	49.79	97.72	-2.28
63.03	63.91	101.40	1.40	62.08	98.50	-1.50
75.78	76.28	100.67	0.67	75.06	99.05	-0.95
89.13	89.24	100.13	0.13	88.65	99.46	-0.54
101.45	101.17	99.73	-0.27	101.16	99.72	-0.28
112.90	112.29	99.46	-0.54	112.82	99.93	-0.07
125.40	124.43	99.23	-0.77	125.55	100.12	0.12
135.85	134.54	99.04	-0.96	136.16	100.23	0.23
146.88	145.26	98.90	-1.10	147.40	100.36	0.36
среднее		100.11			99.46	
$\delta_i = RR-100 \leq 1.22\%$		0.11			0.54	
Вывод по δ		соотв.			соотв.	
SD_{RR}		1.19			0.88	
$\Delta_{sample} = 1.86 \times SD_{RR}$		2.21			1.64	
критерии для $\Delta_{RR} = \Delta_{sample}$:						
<i>подход 1: $\Delta_{sample} \leq 3.90$</i>		-			соотв.	
<i>подход 2: $\Delta_{sample} \leq 2.76$</i>		-			соотв.	
МС: $\Delta_{sample} \leq 3.90$		соотв.				

Таблица 11

Концентрации и абсорбции модельных растворов

C ppm	X%	Параллельные измерения A						Y%	$SD_{A_i} \leq 1.28\%$	Вывод
		1	2	3	4	5	среднее			
1-ый день: калибровка										
2.00	50	0.0497	0.0489	0.0493	0.0493	0.049	0.0492	49.94	0.64	соот.
3.00	75	0.0743	0.0747	0.076	0.0736	0.0739	0.0745	75.56	1.26	соот.
4.00	100	0.0987	0.0992	0.0982	0.0986	0.0983	0.0986	100.00	0.40	соот.
5.00	125	0.1221	0.1211	0.1202	0.1214	0.1214	0.1212	122.96	0.57	соот.
6.00	150	0.1444	0.1448	0.1448	0.1426	0.1432	0.1440	146.00	0.70	соот.
1-ый день: анализ образцов										
4.007	100.2	0.0971	0.0973	0.0967	0.0975	0.0977	0.0973	98.7	0.40	соот.
4.020	100.5	0.0977	0.0970	0.0974	0.0986	0.0971	0.0976	99.0	0.66	соот.
4.000	100.0	0.0974	0.0983	0.0976	0.0966	0.0956	0.0971	98.5	1.07	соот.
2-ой день: калибровка										
2.00	50	0.0516	0.0512	0.0514	0.0516	0.0517	0.0515	51.55	0.39	Соот.
3.00	75	0.0772	0.0774	0.0772	0.0763	0.0758	0.0768	76.88	0.90	Соот.
4.00	100	0.0993	0.1009	0.0991	0.1002	0.1001	0.0999	100.00	0.73	Соот.
5.00	125	0.1263	0.1251	0.1237	0.1227	0.1243	0.1244	124.52	1.10	Соот.
6.00	150	0.1460	0.1464	0.1458	0.1456	0.1457	0.1459	145.05	0.22	Соот.
2-ой день: анализ образцов										
4.027	100.7	0.0995	0.0996	0.0994	0.1004	0.1003	0.0998	99.90	0.47	Соот.
4.004	100.1	0.0991	0.0994	0.0993	0.0997	0.0989	0.0993	99.40	0.31	Соот.
4.027	100.7	0.0991	0.1004	0.1005	0.0995	0.0997	0.0998	99.90	0.60	Соот.

пазона (80-120) %. Требования воспроизводимости определенных концентраций (Табл. 13) выполняются как для МКГ, так и для МС.

В целом, можно сделать вывод, что в ААС для широких диапазонов ((70-130) %, (50-150) %) *Погхог 2* гораздо более надежнее, чем *Погхог 1*.

4.6. Общие выводы о валидации ААС-методики

Суммарные результаты валидации ААС-методики определения железа в препарате *Ges-ticare* представлены в Табл. 14.

Из Табл. 14 видно, что в аналитическом диапазоне концентраций (50-150) % от номинального значения железа в препарате применим только *Погхог 2*, который и можно рекомендовать для применения МКГ в ААС. Для диапазонов (80-

120) % и (70-130) % (т.е. обычных фармакопейных диапазонов [1]) применим МС.

Выводы

Показана метрологическая некорректность фармакопейной процедуры валидации методик атомно-абсорбционной спектrophотометрии (ААС).

Разработана метрологически обоснованная стандартизованная процедура валидации методики количественного определения с помощью ААС в варианте калибровочного графика.

Показано, что более надежным является *Погхог 2*, основанный на предположения равенства неопределенностей калибровки и испытуемой пробы.

Таблица 12

Метрологические характеристики калибровочной прямой (3а) $X\% = b \times Y(\%) + a$

Параметр	Значение	Метод калибровочного графика			
		подход 1		подход 2	
		критерий	вывод	критерий	вывод
1-ый день					
<i>a</i>	-3.16				
<i>s_a</i>	1.52				
<i>b</i>	1.043				
<i>s_b</i>	0.015				
<i>SD_{rest}</i>	1.10	≤ 0.53	нет	≤ 1.17	соот.
<i>R_c²</i>	0.99936				
<i>D</i> (80-120) %		≥ 0.99887	соот.	≥ 0.99450	соот.
<i>D</i> (70-130) %		≥ 0.99950	нет	≥ 0.99756	соот.
<i>D</i> (50-150) %		≥ 0.99982	нет	≥ 0.99912	соот.
2-ой день					
<i>a</i>	-5.35				
<i>s_a</i>	1.06				
<i>b</i>	1.049				
<i>s_b</i>	0.016				
<i>SD_{rest}</i>	1.17	≤ 0.53	нет	≤ 1.17	соот.
<i>R_c²</i>	0.99913				
<i>D</i> (80-120) %		≥ 0.99887	соот.	≥ 0.99450	соот.
<i>D</i> (70-130) %		≥ 0.99950	нет	≥ 0.99756	соот.
<i>D</i> (50-150) %		≥ 0.99982	нет	≥ 0.99912	соот.

Таблица 13

Результаты анализа 3 модельных смесей в 2 разных дня с использованием метода стандарта (МС) и метода калибровочного графика (МКГ)

1-ый день					2-ой день				
<i>X</i> %	<i>Y</i> %	МС	МКГ		<i>X</i> %	<i>Y</i> %	МС	МКГ	
		<i>Z</i> = <i>RR</i> %	<i>X_{calc}</i> %	<i>RR</i> %			<i>Z</i> = <i>RR</i> %	<i>X_{calc}</i> %	<i>RR</i> %
100.18	98.6	98.47	99.74	99.56	100.68	99.92	99.25	100.21	99.54
100.50	98.9	98.45	100.06	99.56	100.10	99.36	99.26	99.62	99.52
100.00	98.5	98.48	99.57	99.57	100.68	99.92	99.25	100.21	99.54
		98.47		99.56			99.25		99.53
$ RR(2) - RR(1) \leq 0.26 \cdot 12.2 = 3.2$							0.78		0.03
							соотв.		соотв.

Показано, что метод стандарта применим в ААС для достаточно узких аналитических диапазонов — не шире (70-130) % от номинального значения.

Разработанная стандартизованная процедура валидации апробирована на ААС количественном определении железа в мультивитаминно-минеральном комплексе *Gesticare*.

ЛИТЕРАТУРА

1. 2.2.23. Атомно-абсорбційна спектрометрія // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-

експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. — Харків: PIPEG, 2001. — Доповнення 3. — Харків, 2009. - С. 27-31.

2. АНД. Аспаркам, розчин для ін'єкцій, по 5 мл і 10 мл в ампулах №10. - АТ «Галичфарм».

3. The United States Pharmacopeia — National Formulary. - USP 33-NF 28. — Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009. - Vol. 1. — 1771 p.

4. 2.2.N.2. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: Pipeg, 2001. — С. 58-67. — Доповнення 1. — 2004. — С. 2-4. — Доповнення 2. — 2008. — С. 85-100. — Доповнення 4. — 2011. — С. 27-28.

Таблица 14

Суммарные результаты валидации методики ААС-определения железа

Наименование	Метод стандарта			Метод калибровочного графика		
	(80-120) %	(70-130) %	(50-150) %	(80-120) %	(70-130) %	(50-150) %
<i>пригодность системы:</i>						
<i>1) схожимость параллельных измерений абсорбции (SD_{A,r})</i>						
требования к SD _{A,r} %	≤ 1.28					
калибровочные растворы	соотв.			соотв.		
модельные растворы	соотв.			соотв.		
растворы для определения внутрилабораторной прецизионности	соотв.			соотв.		
<i>2) требования к калибровочной прямой</i>						
требования к SD _{rest}						
подход 1	≤ 0.53					
подход 2	≤ 1.17					
фактическое SD _{rest}	0.72, 1.10, 1.17					
вывод по SD _{rest}	<i>подход 1 — не соотв.</i> <i>подход 2 — соотв.</i>					
фактическое R _c ²	0.99966, 0.99936, 0.99913					
требования к minR _c ²						
подход 1				0.99944	0.99950	0.99982
вывод по <i>подходу 1</i>				нет	нет	нет
<i>подход 2</i>				0.99450	0.99756	0.99912
вывод по <i>подходу 2</i>				соотв.	соотв.	соотв.
<i>анализ 9 модельных смесей</i>						
критерий max a	≤ 6.1	≤ 4.1	≤ 2.4			
фактическое a	2.85					
	соотв.	соотв.	нет			
фактическое SD _{rest}	0.010					
критерий maxSD _{rest}	≤ 2.06					
вывод по SD _{rest}	соотв.					
фактическое R _c ²	1.00000					
критерий minR _c ²	0.97735	0.98994	0.99638			
вывод по R _c ²	соотв.	соотв.	соотв.			
δ _r = RR-100 ≤ 1.22%	соотв.			соотв.		
<i>фактическое Δ_{RR}</i>						
max Δ _{RR} = maxΔ _{sample} :	2.21			1.64		
<i>подход 1</i> и МС: Δ _{sample} ≤ 3.90	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
<i>подход 2</i> : Δ _{sample} ≤ 2.76	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
общий вывод по валидации						
МС	соотв.	соотв.	нет			
МКГ — <i>Подход 1</i>				нет	нет	нет
МКГ — <i>Подход 2</i>				соотв.	соотв.	соотв.

5. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: ООО «НТ МТ», 2011. — Т. 2.
6. Євтіфєєва О.А. Стандартизація підходів до оцінки якості екстемпоральних лікарських засобів: Автореф. дис. ... д.фарм.н. — Харків, 2011. - 40 с.
7. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. - С. 187-214.
8. Берштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. — Ленинград: «Химия», 1986. — 198 с.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с. — Доповнення 2. - Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 2008. — 620 с. — Доповнення 3. — 2009. — 280 с. — Доповнення 4. — 2011. — 540 с.
10. Левашова О.Л. Валидація методики визначення заліза у вітамінно-мінеральному комплексі. Повідомлення 1 / О.Л. Левашова, С.М. Коваленко // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2011. — № 2. — С. 16-20.
11. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А.И. Гризодуб, Н.Н. Зволинская, Н.Н. Архипова, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Т.Н. Доценко // Фармаком. — 2004. - № 2. — С. 20-34.

Резюме

Гризодуб О.І., Левашова О.Л., Борщевський Г.І.

Стандартизована процедура валидації методик атомно-абсорбційного кількісного визначення лікарських засобів у варіанті калібрувального графіка

Проведено критичний аналіз фармакопейної процедури валидації методик атомно-абсорбційної спектрофотометрії (ААС) і показано її метрологічну некоректність. Розроблено метрологічно обґрунтовану стандартизовану процедуру валидації методик кількісного визначення за допомогою ААС у варіанті калібрувального графіка. Показано, що надійнішим є підхід, що ґрунтується на допущенні рівності

невизначеностей калібрування та проби, що аналізується. Показано також, що для достатньо вузьких аналітичних діапазонів (не ширше (70-130) % від номінального значення) може використовуватися також і метод стандарту. Розроблену стандартизовану процедуру валидації апробовано на ААС-кількісному визначенню заліза у мультівітамінно-мінеральному комплексі *Gesticare*.

Summary

Gryzodub O.I., Levashova O.L., Borshevskiy G.I.

A standardized validation procedure for atomic absorption assays of medicines, using calibration line

A critical analysis of pharmacopoeial validation procedure for atomic absorption medicine assays is conducted and demonstrated its metrological incorrectness. A metrologically substantiated standardized validation procedure for atomic absorption medicine assays using calibration line is developed. It is demonstrated that an approach based on parity of calibration and sample uncertainty is surer. It is also demonstrated that reference method may be applied for sufficiently narrow analytical ranges (within (70-130) % of nominal value). The standardized procedure is tested on ferrous assay in multi-vitamin-mineral complex *Gesticare*.

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

Левашова Ольга Леонидовна. Окончила Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина. Аспирант кафедры управления качеством НФаУ.

Борщевский Геннадий Ильич. Окончил Харьковский политехнический институт, факультет органической химии (1987) и Национальный фармацевтический университет (2008). К.фарм.н (2009). Ведущий специалист департамента биотехнологий ОАО «Фармак».

Будова та властивості

УДК 549.731.13:54.061/.062

Ведерникова І.О., Коваль А.О., Фаталієва А.В.
Національний фармацевтичний університет

Дослідження намагніченості та розміру наночастинок цинкзаміщеного магнетиту

Для синтезованих частинок цинкзаміщеного магнетиту проведено електронно-мікроскопічні дослідження та встановлено залежність величини питомої намагніченості частинок від величини зовнішнього магнітного поля. Виявлена сукупність високих функціональних характеристик синтезованих частинок — питома намагніченість насичення $\sigma = 69.7 \text{ Ам}^2/\text{кг}$ при середньому розмірі частинок $\langle d \rangle \approx 9.6 \text{ нм}$ — дозволяє рекомендувати одержані частинки для використання у складі лікарських препаратів.

Останнім часом спостерігається помітне зростання числа публікацій, присвячених дослідженню використання магнітних наночастинок (звичайно феритів) у складі лікарських препаратів [1-3]. При введенні магнітних наночастинок до складу лікарської форми одержують магнітну композицію, що може керуватися зовнішнім магнітним полем (МП). Зрозуміло, що при створенні лікарських препаратів із магнітними властивостями, доцільно використовувати частинки з високими функціональними (магнітними та розмірними) властивостями. Посаднання високодисперсного розміру з високими значеннями магнітних характеристик є одним з критеріїв використання наночастинок у складі лікарської форми.

При переході від масштабу монокристалічних феритів до нанорозміру (особливо для розмірів до 40 нм) спостерігається суттєве зменшення намагніченості частинок. Це обумовлено значною площею відкритих поверхонь високодисперсних зразків, на яких відбувається "зкошення" магнітної структури (відхилення магнітних моментів атомів від кристалографічної осі) і, як наслідок, зміна магнітних параметрів. Враховуючи надмалий об'єм високодисперсних частинок, від'ємний вклад структурно-дефектного приповерхневого шару в магнітні параметри частинки є суттєвим і він тим більший, чим менша масштабність кристалу [4-7]. При одержанні високодисперсних зразків феритів розміром до (15-20) нм частка структурно-дефектної поверхні становить майже 64 % всього об'єму частинки, що призводить до зменшення намагніченості наночастинок у порівнянні з їх монокристалевими аналогами на 61.5 % [7]. У деяких випадках використання лікарського препарату обумовлює застосування магнітного наповнювача із частинками саме таких розмірів. Так, наприклад, доведено [8], що при створенні магнітокерованих контейнерів-носіїв

протиракових препаратів розміром 200 нм слід використовувати магнітні наночастинки розміром до 11 нм.

Методом хімічної конденсації синтезовано високодисперсні частинки цинк залізо (II) фериту, загальної формули $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$, що можна розглядати як цинкзаміщений магнетит (FeFe_2O_4) [9]. При використанні синтезованих частинок як компонента лікарських препаратів, необхідно провести дослідження їх функціональних характеристик та оцінити стан приповерхневого шару.

Метою даної роботи є визначення функціональних характеристик синтезованих частинок цинкзаміщеного магнетиту — встановлення величини намагніченості насичення та розподілу частинок за розміром.

Матеріали та методи

Зразки цинк залізо (II) феритів одержували методом хімічної конденсації із водних розчинів солей заліза (II), (III) та цинку розчином натрію гідроксиду.

Дослідження розміру синтезованих частинок проводили на трансмісійному електронному мікроскопі JSM-820 (JEOL), $\times 150000$. У дослідженнях використовували зразки у вигляді суспензій. Частинки порошку розганялись за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДА ($\nu = 35 \text{ кГц}$, $t \sim 20 \text{ хв}$). Одержували зображення у планарній геометрії при падінні електронного пучка вздовж гексагональної осі c і перпендикулярно до неї. Знімки обробляли із використанням програм AutoCAD 2004 та MathCAD 2001.

Намагніченість зразків феритів визначали мостовим методом [10], висмикуванням дослідного зразка в ампулі із зони постійного МП. Зміну магнітного потоку, пропорційну магнітному моменту зразка, реєстрували за допомогою мікробеерометра. Визначення повторю-

вали не менше трьох разів. За результат приймали середнє арифметичне значення, при допустимому відхиленні ± 0.2 кА/м. Визначення параметрів кривої намагнічування починали з найменшого значення напруги МП, поступово збільшуючи його до досягнення постійних значень намагніченості насичення.

Результати досліджень та їх обговорення

На Рис. 1 наведено електронні мікрофотографії синтезованих наночастинок. Як можна побачити, морфологія всіх частинок однакова. Візуально форма частинок виражена не чітко та сприймається як сферична. Взагалі частинки феритів із структурою шпінелі мають октаедричну форму.

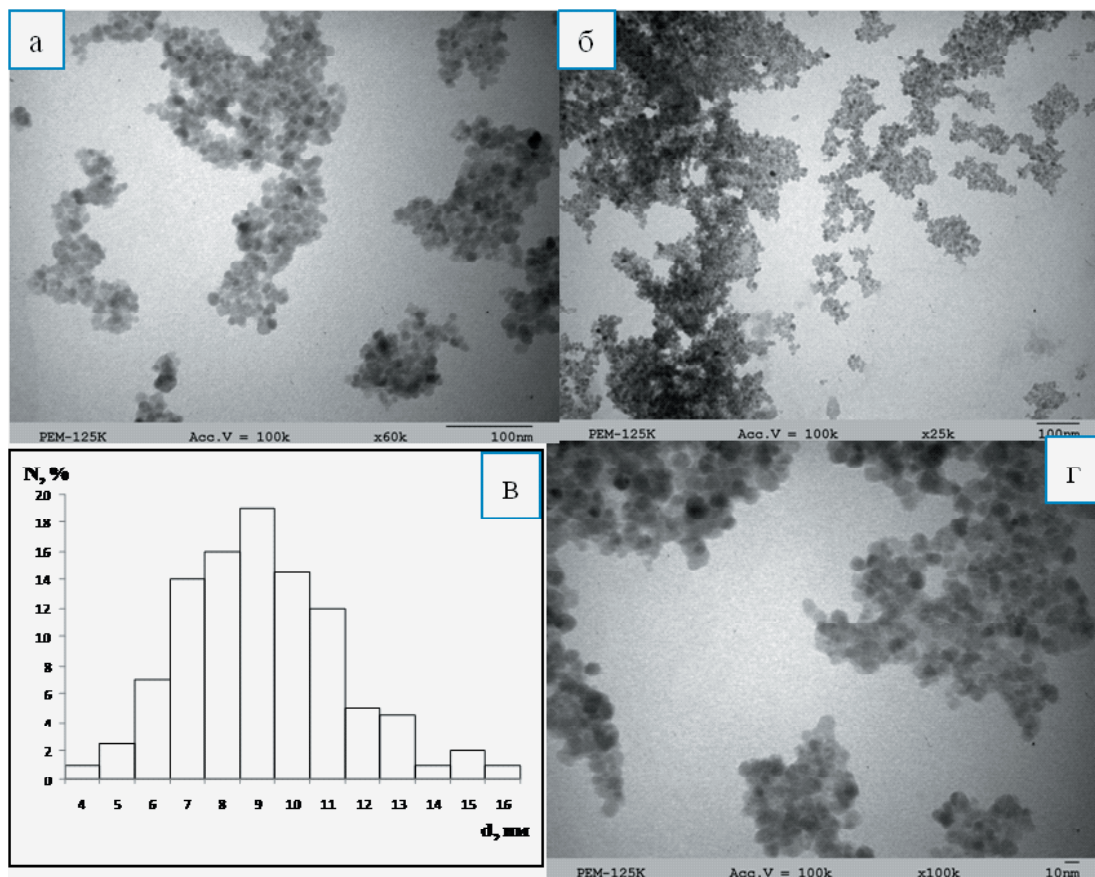
На підставі проведених мікроскопічних досліджень одержано функцію розподілу частинок за розміром із вибіркою 500 частинок (Рис. 1, в). Розподіл $N = f(d)$ наближений до симетричного, діапазон значень $d = (5 \div 13)$ нм, середнє значення діаметра частинок $\langle d \rangle \approx 9.6$ нм. Важливо, що майже 80 % частинок мають діаметр $(7.0 \div 10.5)$ нм, що характеризує одержаний зразок

як однорідну систему. За теорією доменів розрізняють суперпарамагнітний, однодомений, псевдомонений і багатодомений стани. Згідно із принципом найменшої енергії, утворення доменів обумовлене виграшем магнітної енергії. Для зразків магнетиту із частинками приблизно сферичної форми за кімнатної температури експериментально було встановлено [11] значення верхньої межі однодоменого стану: $d = 29 \div 36$ нм. Враховуючи, що дослідний зразок є аналогом магнетиту, відповідно до розміру можемо констатувати однодомений стан із наближенням до суперпарамагнітного.

На Рис. 2 наведено залежність відносної питомої намагніченості від дисперсності частинок, що була встановлена [12] для частинок $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Досягнення значень намагніченості монокристалевого зразка $\sigma/\sigma_s = 1$ (Рис. 2) для дослідних високодисперсних частинок відбувається в інтервалі значень розміру наночастинок ≥ 40 нм. При цьому значне збільшення намагніченості спостерігається у дуже вузькому розмірному

Рисунок 1



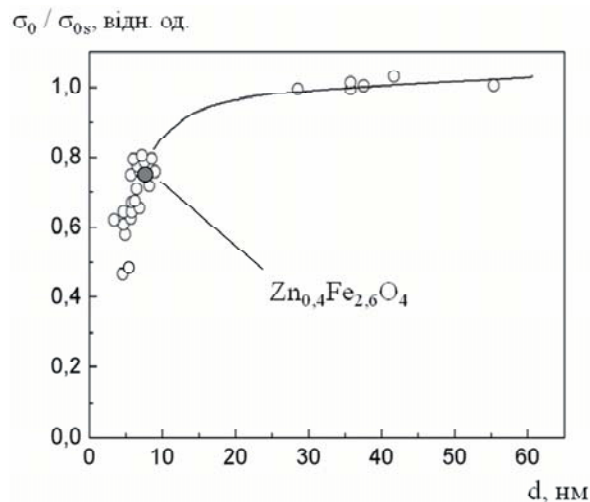
Електронні мікрофотографії зразка цинк фериту

а) $\times 60$, б) $\times 25$, г) $\times 100$,

в) — діаграма розподілу частинок за розміром.

інтервали — (5-15) нм. У цих межах збільшення діаметра на кожний нанометр призводить до збільшення намагніченості в 1.5 рази.

Рисунок 2



Нормована функція питомої намагніченості частинок $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ різної дисперсності

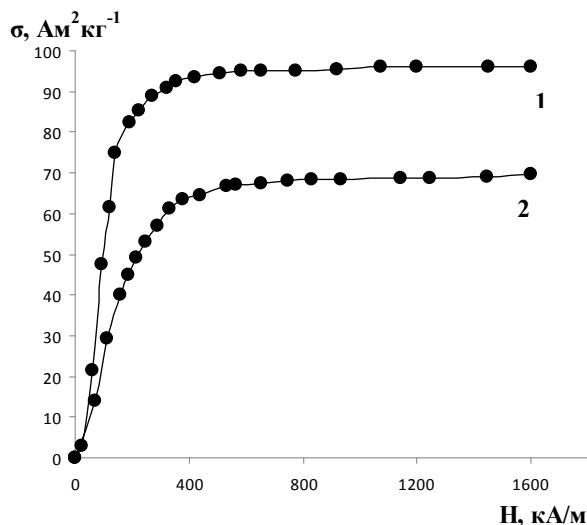
При заміщенні у магнетиті іонів Fe^{2+} іонами Zn^{2+} утворюється змішана шпінель $\text{Zn}^{2+}_{0.4}\text{Fe}^{3+}_{1.6}\text{O}_4$. На Рис. 2 наведено значення відносної питомої намагніченості, що має відповідати дослідному зразку цинк залізо (II) фериту (середній діаметр частинок 9.6 нм). Таке порівняння параметрів є можливим, оскільки синтезований зразок є аналогом магнетиту, γ -модифікацію якого і наведено на Рис. 2.

Доцільність теоретичних припущень було підтверджено експериментальним шляхом. Для синтезованих наночастинок цинк залізо (II) фериту було досліджено залежність величини намагніченості від величини зовнішнього МП (Рис. 3).

Одержані криві залежності $\sigma(H)$ експериментального високодисперсного зразка та його макроаналога схожі. Максимальна намагніченість (намагніченість насичення) зразків досягається в полях $H \geq 800$ кА/м, але суттєво (майже в 1.3 рази) відрізняється за величиною. Для високодисперсного зразка питома намагніченість прогнозовано менша, але істотна, та становить $69.7 \text{ Ам}^2/\text{кг}$, що майже співпадає зі значенням, одержаним згідно з Рис. 2 ($\sigma \approx 71 \text{ Ам}^2/\text{кг}$). Близькість одержаних результатів є фактом, що підтверджує залежність магнітних характеристик частинок від розміру та доводить задовільний стан структури частинок із невеликою товщиною приповерхневого шару. Ефект зменшення намагніченості зі зменшенням розміру частинок наглядно продемонстровано на рис. 2, ця залежність може бути використа-

на взагалі для аналізу частинок зі структурою шпінелі з відомим одним параметром (розмір або намагніченість).

Рисунок 3



Криві намагнічення при 300 К макрокопічного аналога (1) і високодисперсного зразка (2) $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$

Висновки

Проведеними дослідженнями розміру та намагніченості синтезованих частинок цинкзаміщеного магнетиту, було підтверджено взаємозалежність цих параметрів для системи частинок шпінельної структури з розміром до 40 нм.

Метод хімічної конденсації дозволяє одержувати частинки цинкзаміщеного магнетиту із сукупністю високодисперсного розміру (9.6 нм) та високим (відповідно до розміру) значенням магнітних характеристик — питома намагніченість насичення $69.7 \text{ Ам}^2/\text{кг}$. Таким чином, синтезовані частинки можна рекомендувати для подальших досліджень із метою їх використання у складі лікарських препаратів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Koppiseti V. Magnetically modulated drug delivery systems / V. Koppiseti, B. Sahiti // Int. J. Drug Dev. & Res. - 2011. - Vol. 3, № 1. - P. 260-266.
2. Sakamotoa J. Enabling individualized therapy through nanotechnology / J. Sakamotoa, A. Van de Vena, B. Godina // Pharmacol Res. - 2010. - Vol. 62, № 2. - P. 57-89.
3. Latorre M. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia / M. Latorre, C. Rinaldi // Health Sci. J. - 2009. - Vol. 28, № 3. - P. 227-38.
4. Dutz S. Hysteresis losses of magnetic nanoparticle powders in the single domain size range / S. Dutz, R. Hergt // J. Magn. Mater. - 2007. - № 308 (4). - P. 305-312.
5. Goya G.F. Structural and magnetic properties of ball milled copper ferrite / G.F. Goya, H.R. Rechenberg, J.Z. Jianga // J. Appl.Phys. - 1998 - Vol. 84, № 2. - P. 1101-1108.
6. Morrison S. Magnetic and structural properties of nickel zinc ferrite nanoparticles synthesized at room temperature / S. Morrison, C. Cahill, E. Carpenter // J. Appl. Phys. - 2004. - Vol. 95, № 11. - P. 6392-6395.

7. Myndyk M. Nanocrystalline BaFe₁₂O₁₉ and SrFe₁₂O₁₉ hexaferrites prepared by top-down approach / M. Myndyk, A. Feldhoff, D. Menzel // Materials of Students Conference. — Hannover, 2008. — P. 325-327.
8. Брусенцов Н.А. Физические и химические критерии ферритмагнетиков для биомедицинских целей / Н.А. Брусенцов, В.В. Гогосов, М.В. Лукашевич // Хим.-фарм. журнал. — 1996. - № 10. — С. 48-53.
9. Ведерникова І.О. Синтез, властивості та біологічна активність магнетиту та магнітокерованої рідини: Дис. ... к.фарм.н.: 15.00.02. — Харків, 2006. — 133 с.
10. ГОСТ 8.377 — 80. Методика выполнения измерений при определении статических магнитных характеристик. — Введ. 01.07.1981. — М.: Изд-во стандартов, 1981. — 21 с.
11. Киршвинк Д. Биогенный магнетит и магниторецепция / Д. Киршвинк, Б. Мак-Фадена /Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — Т. 1. — 352 с.
12. Berkowitz A.E. Influence of crystallite size on the magnetic properties of acicular γ -Fe₂O₃ particles / A.E. Berkowitz, W.J. Schuele, P.J. Flanders // J. Appl. Phys. — 1968. — № 39. — P. 1261-1263.

Резюме

Ведерникова И.А., Коваль А.А., Фаталиева А.В.

Исследование намагниченности и размера наночастиц цинкзамещенного магнетита

Для синтезированных частиц цинкзамещенного магнетита проведены электронномикроскопические исследования, определена зависимость величины удельной на-

магниченности частиц от величины внешнего магнитного поля. Установленная совокупность высоких функциональных характеристик синтезированных частиц — намагниченность насыщения $\sigma = 69.7 \text{ Am}^2/\text{kg}$ при среднем размере частиц $\langle d \rangle \approx 9.6 \text{ nm}$ — позволяет рекомендовать полученные частицы для использования в составе лекарственных препаратов.

Summary

Vedernikova I.A., Koval A.A., Fataliyeva A.V.

Study of magnetization and the size of nanoparticles of zinc substituted magnetite

For the synthesized zinc substituted magnetite particles the electron microscopic studies were conducted, the dependence of specific magnetization of the particles on the external magnetic field was determined. The established range of high-functional characteristics of the synthesized particles (the magnetization of saturation $\sigma = 69.7 \text{ Am}^2/\text{kg}$ with an average particle size $\langle d \rangle \approx 9.6 \text{ nm}$) allowed recommendation of obtained particles for the use in medicines.

Ведерникова Ирина Олександрівна. К.фарм.н. Доцент кафедри неорганічної хімії НФаУ.

Коваль Алла Олександрівна. К.фарм.н. Асистент кафедри неорганічної хімії НФаУ.

Фаталієва Аліна Вячеславівна. Ст. лаборант кафедри неорганічної хімії НФаУ.

Готові лікарські засоби

УДК 615.2/3:666.176]6543.544.3

Зинченко А.А.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Определение состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах

Предложена методика качественного и количественного определения состава газовой фазы над инъекционными растворами в ампулированных лекарственных препаратах методом адсорбционной газовой хроматографии. Установлены требования к хроматографической системе и экспериментально показано, что некоторые используемые в ГХ молекулярные сита пригодны для анализа газовой фазы в первичной упаковке. Предложена методика отбора газовой фазы из ампул, которая исключает загрязнение анализируемой пробы компонентами воздуха. Определены метрологические характеристики методики.

Ряд ампулированных инъекционных препаратов имеют в своем составе действующие или вспомогательные вещества, способные в растворенном виде реагировать с кислородом. При этом образуются продукты окисления, являющиеся примесями, которые ухудшают качество лекарственных препаратов. При производстве таких препаратов для предотвращения окислительных процессов практикуется удаление остаточных количеств кислорода непосредственно из растворов, а также замещение воздуха газовой фазы в ампуле инертным газом, наиболее часто азотом, значительно реже аргоном и

другими инертными газами, непосредственно перед запайкой ампулы.

От качества проведения операции по замещению воздуха зависит остаточная концентрация кислорода в газовой фазе ампулы и, соответственно, скорость образования продуктов окисления, сохранность препарата и его срок годности. Поэтому установление состава газовой фазы в ампулированном препарате может оказаться весьма полезной на стадии выходного контроля готовой лекарственной формы. Еще более полезной может быть контроль газовой фазы в ампулированных препаратах на стадиях

отладки оборудования, при проведении пусконаладочных работ, валидационных исследований технологических процессов и других технологических операциях.

Целью данной работы является разработка надежного и доступного метода контроля состава газовой фазы в запаянных ампулах.

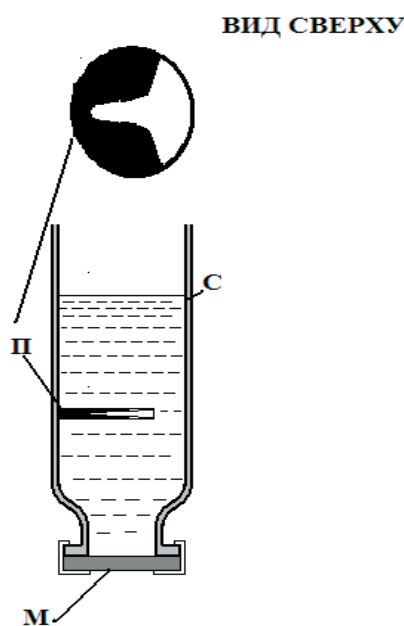
По данным фирмы «Bayer AG» контроль состава газовой фазы в запаянных ампулах может быть проведен спектральными методами, помещая ампулу в высокочастотное электромагнитное поле; ультразвуковым сканированием, измеряя скорость звука в газовой фазе, и другими физическими методами. Эти методы позволяют проводить измерения без вскрытия первичной упаковки, но точность измерения при этом невелика, и обнаружить менее 1 % остаточного кислорода не представляется возможным.

Наиболее надежные результаты измерения состава газовой фазы могут быть получены при использовании метода газовой хроматографии [1, 2]. Этот метод позволяет надёжно контролировать содержание кислорода в газовой фазе до 0.005 % и устанавливать газовый состав [3]. Применение этого метода предполагает вскрытие ампулы, отбор газовой пробы и её хроматографирование. Поскольку объём газовой фазы в ампулах вместимостью (1 – 2) мл незначителен (около 150 мкл), её отбор должен проводиться, по возможности, полно, избегая при этом попадания воздуха и жидкой фазы в отбираемую пробу. Для отбора таких малых газовых проб были использованы газоплотные шприцы вместимостью (100-250) мкл и изготовленное автором приспособление (Рис. 1). Это приспособление состоит из прозрачного стеклянного сосуда (С) у которого удалено дно, а горловина закрыта силиконовой мембраной (М), которую используют для герметизации сосудов при проведении анализа равновесной паровой фазы. Внутри сосуда клеём закреплена изготовленная из сплава Т15К6 пластина (П), в которой сделан V-образный заточенный пропилен.

При отборе пробы в сосуд помещают около 10 мл свежепрокипяченного насыщенного раствора натрия хлорида, ампула опускается в раствор вверх дном таким образом, чтобы уровень отрезания находился под слоем жидкости (Рис. 2), с помощью пропила твердосплавной пластины делается надрез ампулы (А) и отламывается конец ампулы (Б). Поскольку все операции проводят в слое жидкости, контакт газовой фазы ампулы с атмосферой отсутствует. Высокая плотность насыщенного раствора натрия хлорида предотвращает быстрое пере-

мешивание самого препарата с раствором, помещенным в сосуд.

Рисунок 1



Приспособление для вскрытия и отбора газовой фазы в ампулах

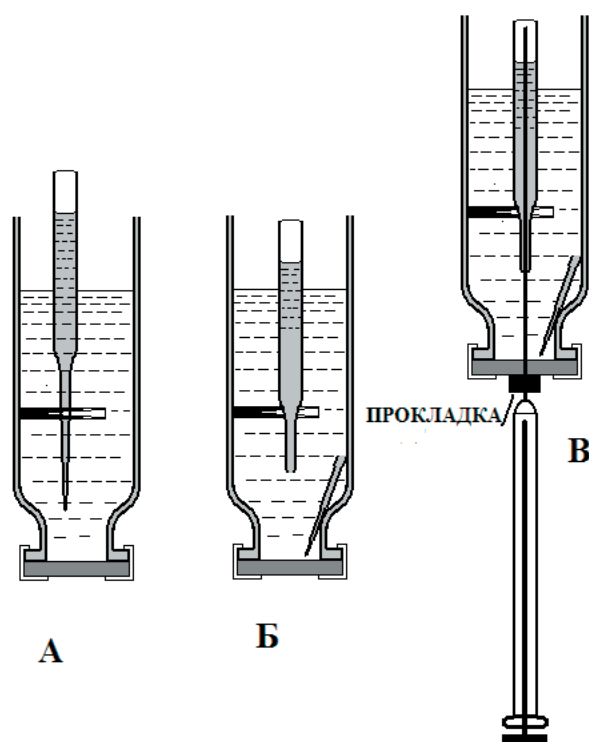
Отбор газовой фазы ампулы проводится предварительно промытым газом-носителем газоплотным шприцом, на иглу которого надета резиновая прокладка от блоков испарителей газовых хроматографов (В). После отбора пробы шприц вынимают из ампулы и сосуда, а конец иглы шприца герметизируют резиновой прокладкой. Ввод пробы осуществляют обычным способом.

Хроматографические условия при определении состава газовой фазы зависят от компонентного состава газа, которым заполняют ампулы. Поскольку наиболее часто для этих целей используют азот, причем технический очищенный, в данной работе основное внимание было уделено этому случаю.

Из трех распространенных способов получения азота (абсорбционного, диффузионного и криогенного) в фармацевтической промышленности используют азот, полученный криогенным способом. При этом способе окончательная очистка азота от кислорода проводится путем поглощения активными по отношению кислорода веществами. В результате этой очистки в азоте повышается содержание другой примеси — аргона, что было установлено при хроматографировании реальных образцов препаратов (Рис. 4).

Поскольку аргон является инертным газом, на сохранность препаратов он не влияет. Однако пара аргон — кислород на обычно применяемых для анализа газов сорбентах (молекулярные сита) является трудно разделяемой [4] и в обычных условиях элюируется одним пиком, что не позволяет получать достоверные результаты. Поэтому условие - практически полное разделение пиков кислород — аргон - является обязательным для методики определения состава газовой фазы в ампулах. Для надежного разделения этой пары используют охлаждение хроматографической колонки до температуры — 20 °С и ниже, либо применяют капиллярные колонки и адаптированные к ним детекторы [3]. И первый, и второй варианты требуют дополнительного оборудования, которое монтируется или уже установлено на хроматограф в заводских условиях и фактически превращает этот прибор в узкоспециализированный, рассчитанный только на анализ газовых смесей. Поэтому было проведено исследование молекулярных сит различных марок и производителей на разделяющую способность пары аргон — кислород при температуре колонки 0 °С, поскольку поддержание этой температуры не требует дополнительных затрат и в качестве охладителя может быть применена смесь во-

Рисунок 2



Последовательность отбора газовой фазы из запаянной ампулы

ды и льда. Термостатирование колонки проводили путем её погружения в смесь воды и льда, которую помещали в сосуд Дьюара вместимостью около 3 л.

Таблица 1

Результаты определения разделяющей способности сорбентов

Сорбент, производитель	Коэффициент разделения пары аргон - кислород
Molecular Sieve 5A, «Supelco», cat No 2-03-01, (45-60) mesh, lot V0436 2006 г (США)	1.283
Molecular Sieve 5A, (60-80) mesh, lot 25968 (Shimadzu, Япония, 1987 г.)	1.475
Molecular Sieve 5A, (60-80) mesh. (Serva, Германия, 1976 г.)	1.326
Цеолитный сорбент СаА, партия 2, «Реахим», 1984 г. Измельчен из гранул размером 5 мм, выделена фракция (0.18-0.20) мм	1.120
Цеолитный сорбент СаА, партия 4, «Реахим», 1988 г. Измельчен из гранул размером 5 мм, выделена фракция (0.18-0.20) мм	1.054
Цеолитный сорбент СаА, партия 12, «Реахим», 1989 г. Измельчен из гранул размером 5 мм, выделена фракция (0.20-0.25) мм	1.560
Цеолитный сорбент NaА («Сорбис», Российская Федерация, 2009 г.) Измельчен из шарообразных гранул размером (4-6) мм, выделена фракция (0.18-0.20) мм	1.459
Цеолит синтетический NaА, ТУ 2163-005-21742510-2004 (ООО Завод молекулярных сит «Реал Сорб», Российская Федерация, 2008 г.) Измельчен, выделена фракция (0.20-0.25) мм	1.410

Вентилятор для перемешивания воздуха в термостате хроматографа при этом отключали. Одной заправки сосуда Дьюара смесью воды и льда достаточно для работы в течение 24 ч. В качестве газовой пробы использовали воздух. Предварительно заполненные сорбентами колонки кондиционировали при температуре 380 °С в течение 6 ч. Результаты приведены в Табл. 1.

Хроматографирование проводили на хроматографе GC-14В, оснащенном компьютери-

зированным интегратором модели C-R7A, петлевым дозатором газовых проб MGS-4 (0.5 мл), производства корпорации «Шимадзу», Япония. Типичная хроматограмма воздуха при практически полном разделении пиков аргона и кислорода приведена на Рис. 3.

Как видно из представленных данных, некоторые из исследованных сорбентов обеспечивают необходимый для получения достоверных результатов коэффициент разделения пиков аргона и кислорода (более 1.4) при температуре плавления воды, что позволяет применить эти сорбенты для контроля газовой фазы в запаянных ампулах.

Таким образом, возможен такой вариант методики:

(100-200) мкл газовой фазы из ампулы, хроматографируют на газовом хроматографе с термокондуктометрическим детектором в следующих условиях:

- колонка стеклянная, размером 3,2 м × 0,32 см, заполненная сорбентом «Молекулярные си-

- та 5А», размер частиц (80-100) меш;
- температура колонки — 0 °С;
- скорость газа-носителя (гелий) — 30 мл/мин;
- температура детектора — 50 °С;
- ток детектора — 80 % от предельного, указанного в инструкции по эксплуатации прибора (для модели GC-14B — 160 мА).

Содержание каждого компонента газовой фазы ампулированного препарата вычисляют по формуле:

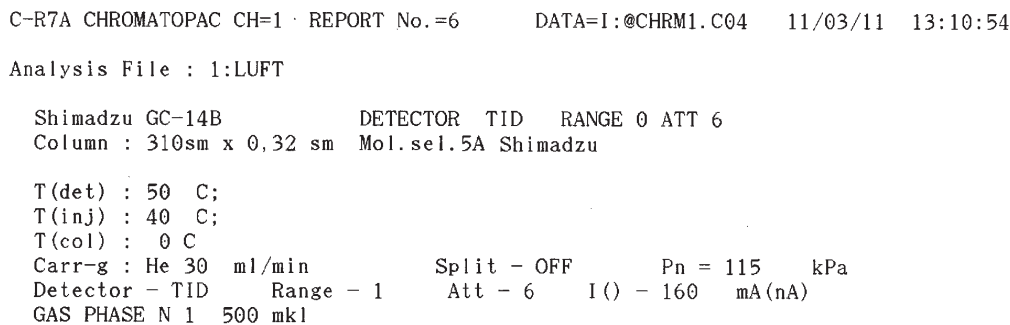
$$\frac{S_i \times 100}{\sum S}$$

где:

- S_i — площадь пика определяемого компонента на хроматограммах испытуемой пробы;
- $\sum S$ — суммарная площадь всех пиков на хроматограммах испытуемой пробы.

Для большинства случаев при использовании гелия или водорода в качестве газа-носителя

Рисунок 3



Хроматограмма пробы воздуха, полученная при определении разделяющей способности сорбентов

Таблица 2

Результаты определения концентрации аргона и кислорода в атмосферном воздухе

Наименование определяемого компонента	Введено (% об/об)	Введено (в нормализованных %)	Найдено	
			%, об/об	в нормализованных координатах (%)
АРГОН	0.934	100	0.9305	99.627
			0.9381	100.443
			0.9310	99.678
			0.9465	101.341
			0.9322	99.810
			0.9312	99.698
			0.9283	99.392
			среднее значение, $Z_{cp}, \%$	
систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $			0.002	
относительное стандартное отклонение, $RSD_{z1}, \%$			0.675	
доверительный интервал $\Delta_z \% = t(7-2) \times RSD_z = 2.015 \times 0.675$			1.36	
КИСЛОРОДА	20.9486	100	20.967	100,088
			21.113	100,785
			20.982	100,161
			20.967	100,089
			20.988	100,187
			20.937	99,946
			21.035	100,41
			среднее значение, $Z_{cp}, \%$	
систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $			0.231	
относительное стандартное отклонение, $RSD_{z1}, \%$			0.279	
доверительный интервал $\Delta_z \% = t(7-2) \times RSD_z = 2.015 \times 0.279$			0.56	

Таблица 3

Результаты определения концентрации аргона и кислорода в газовой смеси содержащей по 1 % аргона и кислорода

Наименование определяемого компонента	Введено (% об/об)	Введено (в нормализованных %)	Найдено	
			%, об/об	в нормализованных координатах (%)
АРГОН	1.00	100	1.008	100.8
			1.010	101.0
			0.994	99.4
			0.998	99.8
			1.016	101.6
			0.995	99.5
			0.998	99.8
			среднее значение, $Z_{cp}, \%$	
систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $			0.20	
относительное стандартное отклонение, $RSD_{z1}, \%$			0.736	
доверительный интервал $\Delta_z \% = t(7-2) \times RSD_z = 2.015 \times 0.736$			1.48	
КИСЛОРОДА	1.00	100	1.003	100,3
			1.000	100
			1.008	100,8
			0.997	99,7
			0.998	99,8
			0.999	99,9
			1.014	101,4
			среднее значение, $Z_{cp}, \%$	
систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $			0.27	
относительное стандартное отклонение, $RSD_{z1}, \%$			0.619	
доверительный интервал $\Delta_z \% = t(7-2) \times RSD_z = 2.015 \times 0.619$			1.25	

различием в теплопроводности определяемых компонентов можно пренебречь. При необходимости снижения ошибки результатов, нужно учитывать поправочные коэффициенты, которые для каждого конкретного прибора и термокондуктометрического детектора могут быть определены путем хроматографирования калибровочной смеси газов с точно известным составом. В этом случае, содержание каждого компонента газовой фазы вычисляют по формуле:

$$\frac{k_i S_i \times 100}{\sum(k_i S_i)}$$

где:

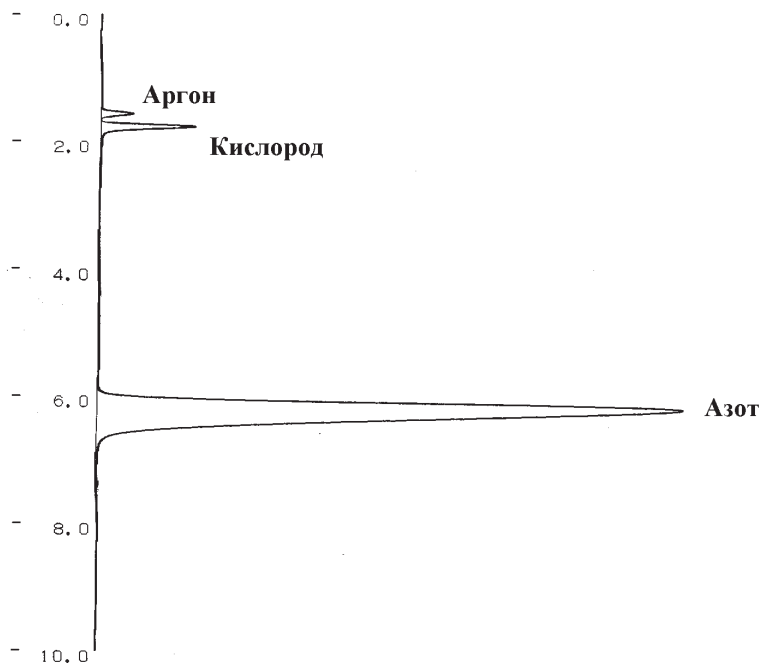
- S_i — площадь пика определяемого компонента на хроматограммах испытуемой пробы;
- k_i — поправочный коэффициент для определяемого компонента;
- $\sum(k_i S_i)$ — суммарная площадь всех пиков на хроматограммах испытуемой пробы, с учетом поправочных коэффициентов.

Газовая проба, отобранная над инъекционным раствором, содержит водяные пары, которые в условиях определения газового состава сорбируются на молекулярных ситах. Чтобы

Рисунок 4

Analysis File : 1:LUFT

Shimadzu GC-14B DETECTOR TID RANGE 0 ATT 6
 Column : 310sm x 0,32 sm Mol.sel.5A 0.2-0.25 mm
 T(det) : 50 C;
 T(inj) : 40 C;
 T(col) : 0 C
 Carr-g : He 30 ml/min Split - OFF Pn = 115 kPa
 Detector - TID Range - 1 Att - 6 I () - 160 mA(nA)
 GAS PHASE N 1 200 mkl



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	29	1.626	1262	289	V	1	1.2599	Ar
	30	1.767	4761	844	SV	2	4.7527	O2
	44	6.207	94143	5179	V	3	93.9874	N2
TOTAL			100166	6312			100	

Хроматограмма пробы газовой фазы ампулы, полученная при валидации технологического процесса запайки в инертном газе (цеолитный сорбент CaA, партия 12 («Реахим» 1989 г.))

предотвратить вызванное поглощениями паров воды изменение свойств сорбента в начальную часть колонки помещали фторопластовую вставку внутренним диаметром 2.0 мм и длиной 55 мм, заполненную гранулированным магнезиальным перхлоратом безводным. Такая вставка позволяет провести более 100 хроматографирований без заметного изменения хроматографических характеристик колонки.

Метрологические характеристики методики были оценены путем хроматографирования атмосферного воздуха и газовой смеси азот — кислород — аргон с концентрациями аргона и кислорода по 1 % [5, 6], поскольку эти концентрации газов реально встречаются при контроле качества препаратов.

Для расчета метрологических характеристик методики при хроматографировании воздуха использовали табличные значения содержания кислорода (20.948 %) и аргона (0.934 %). Смесь с содержанием по 1 % кислорода и аргона готовили в лабораторных условиях. Именно эти концентрации были выбраны как наиболее часто встречающиеся при определении реальных объектов. Результаты расчета представлены в Табл. 2 и 3.

Как видно из приведенных данных, систематическая ошибка определения кислорода в газовой смеси не превышает 0.3 %. Величина стандартного относительного отклонения около 0.7 %. При этом суммарное значение неопределенности результатов методики при использовании стандартизованных калибровочных смесей газов для определения поправочных коэффициентов не превышает 1.5 %. Эти величины метрологических характеристик более чем достаточны для методики определения примесей, каковым в данном случае является кислород.

Приведенная выше разработанная методика была использована для контроля ряда ампулированных препаратов, в том числе и препарата «Мильгама», а так же при валидации технологических процессов производства инъекционных препаратов. Типичная хроматограмма, полученная при определении состава газовой фазы в запаянной ампуле при валидации технологического процесса запайки в инертном газе, представлена на Рис. 4.

Выводы

Определены требования к методике определения газовой фазы в запаянных ампулах инъекционных препаратов. Экспериментально показано, что достоверные результаты определения остаточных количеств кислорода

возможно получить при условии разделения пары аргон — кислород.

Проведено исследование ряда наиболее распространенных для контроля постоянных газов сорбентов на способность разделения пары кислород — аргон при температуре плавления воды, что позволяет проводить анализ без использования дополнительных приспособлений для аналитического оборудования.

На основании полученных результатов разработана методика определения газовой фазы в запаянных ампулах инъекционных препаратов и разработан способ отбора газовой фазы из ампулы, при котором исключается попадание компонентов воздуха и паров раствора в исследуемую пробу.

Исследованы основные метрологические характеристики разработанной методики. Полученные результаты показывают, что методика позволяет проводить определение газовой фазы с требуемой для примесей неопределенностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1978. — 180 с.
2. Количественный анализ хроматографическими методами: Пер. с англ. / Под ред. Э. Кэц. — М.: Мир, 1990. — 320 с.
3. Другов Ю.С. Газохроматографический анализ газов / Ю.С. Другов, Л.А. Конопелько. — М.: МОИМПЕКС, 1995. — 464 с.
4. Коцев Н. Наръчник по газова хроматография / Н. Коцев, Н. Пецев. — София: Ун-тско изд-во «Св. Климент Орхидски», 1994. — 439 с.
5. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководство по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского Е.П. Безуглой. — К.: МОРИОН, 2001. - 472 с.
6. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпруджников // Фармаком. — 2004. - № 3. — С. 3-17.

Резюме

Зінченко О.А.

Визначення складу газової фази в ампульованих лікарських засобах

Запропоновано методику якісного та кількісного визначення складу газової фази над ін'єкційними розчинами в ампульованих лікарських препаратах методом адсорбційної газової хроматографії. Встановлено вимоги до хроматографічної системи й експериментально показано, що деякі використовувані у ГХ молекулярні сита придатні для аналізу газової фази у первинній упаковці. Запропоновано методику відбору газової фази із ампул, що виключає забруднення аналізованої проби компонентами повітря. Визначено метрологічні характеристики методики.

Summary

Zinchenko A.A.

Determination of constituents of gas phase of drugs in ampoules

The technique of qualitative and quantitative determination of gas phase above the injection solution in ampoules with

drugs by adsorption gas chromatography (GC) was given. The requirements to the chromatographic system were established. It was shown experimentally that some frequently used in the GC molecular sieves were suitable for the analysis of the gas phase in the primary packaging. The technique of sampling of the gas phase from vials, which prevented contamination of the sample with air components, was proposed. Metrological characteristics of that method have been defined.

Зинченко Александр Анатольевич (р. 1956). Окончил Харьковский государственный университет (1983). Зав. лаб. фармакопейного анализа ГП НЭФЦ. К.фарм.н. (2006).

УДК 615.454.1:615.28:616-001.4:547.288.15:547.587.11

Філімонова Н.І., Спиридонов Д.А., Рибалкін М.В.
Національний фармацевтичний університет

Дослідження осмотичної активності мазі протимікробної дії для лікування ранового процесу на першій стадії

Приведені результати експериментального дослідження осмотичної активності м'якої лікарської форми з ліпофільним екстрактом бруньок тополі китайської. Експериментально встановлено, що зразки мазі на емульсійній основі типу олія/вода (о/в) та вода/олія (в/о) мають слабу осмотичну активність, у той час як зразки мазі на гідрофільній основі мають виражену осмотичну активність. Результати дослідження дозволяють створити м'яку лікарську форму із рослинним екстрактом, що призначена для лікування інфекційних ускладнень на першій стадії ранового процесу.

У теперішній час одним з актуальних питань, що стоять перед фармацевтичною наукою, є розробка мазей на основах, що відповідають вимогам, пред'явленим до характеру ранового процесу (перша, друга фази) і типу ураження (хірургічні, дерматологічні тощо) [1, 4].

Одним із найважливіших показників специфічної дії лікарських препаратів для місцевого лікування запальних процесів є кінетика абсорбції води (осмотична активність). Цей показник пов'язаний із регулюванням проникнення лікарського засобу у тканини та, у разі необхідності, прояву дегідратаційного впливу лікарського препарату на осередок запалення й оточуючі тканини, що призводить до зменшення набряку, сприяє прискоренню обмінних процесів і нормалізації стану хворого [5, 8].

Осмоз (від. грец. *ὄσμος* – тиск) – однобічний перебіг (дифузія) однієї речовини (розчинника) в іншу крізь напівпроникну мембрану, обумовлений наближенням системи до термодинамічної рівноваги з вирівнюванням концентрації дифундуючої речовини по обидва боки мембрани [7].

Чітко визначена осмотична активність мазевих основ набуває особливого значення при лікуванні ранового процесу відповідно до стадії його протікання. На першій стадії ранового процесу осмотична активність є додатковим лікувальним фактором, що ліквідує тканинну гіперемію та запальний набряк, усуває явища інтоксикації та забезпечує швидке очищення рани від ранового ексудату; помірна осмотична активність сприяє процесу загоєння пошкоджених тканин у другій фазі [1, 4, 7].

Вирішуючи питання застосування мазі у клінічній практиці, слід врахувати її осмотичні властивості, що визначатимуть специфічну активність лікарської форми та межі її застосування [4, 14].

Враховуючи те, що при рановому процесі на першій стадії з'являється досить багато ексудату, при очищенні рани виникає необхідність створення умов, за якими б основа мала значну осмотичну активність та добре змішувалась з ексудатом [2, 3, 8, 14].

Метою даної роботи є розробка складу комбінованої мазі протимікробної дії, призначеної для лікування інфекційних ускладнень ран, з урахуванням фазності ранового процесу, до складу якої входить ліпофільний екстракт бруньок тополі китайської (ЛЕБТ), який має виражену протимікробну дію по відношенню до *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 49619, *Candida albicans* ATCC 885-653 [9, 10], а також вивчення осмотичних властивостей мазей, розроблених на різних типах основ, для вибору мажевої основи, що є найбільш доцільною для застосування даного лікарського засобу у лікуванні ранового процесу на першій стадії.

Експериментальна частина

Як відомо [1, 14] гідрофобні основи виявляють низьку (близьку до нульової) осмотичну активність. Враховуючи результати мікробіологічного скринінгу [10], було вирішено не використовувати такі основи у подальших дослідженнях.

Для вивчення осмотичної активності розробленої мазі, що містить 5% ліпофільного екстракту бруньок тополі китайської, нами були виготовлені дослідні зразки на різних основах. Концентрація діючої речовини була обрана на підставі попередніх досліджень [10]. Склад модельних композицій наведено в Табл. 1.

Таблиця 1

Склад модельних композицій

Тип маzewої основи	Допоміжні речовини
емульсійна типу о/в	масло вазелінове — 10.0 г
	ПЕО-400 — 10.0 г
	емульгатор №1 — 8.0 г
	вода очищена до 100.0 г
емульсійна типу в/о	вазелін — 60.0 г
	емульгатор Т2 — 10.0 г
	вода очищена до 100.0 г
гідрофільна	ПЕО-400 - ПЕО-1500 (7:3)
гідрофільна	ПЕО-400 - ПЕО-1500 (8:2)

В якості препарату порівняння використовували мазь «Левосин» на гідрофільній основі.

Кінетику абсорбції води мазевими основами визначали в досліді *in vitro* методом діалізу крізь напівпроникну мембрану із целофану (ГОСТ 7730-89), подібного до пористого целюлозного матеріалу Surgorphan, Туре 150 pm, (11 ± 0.5) мкм завтовшки [11], при температурі (37 ± 0.1) °С за зміною маси камери зі зразком [12, 13]. У процесі діалізу крізь мембрану відбувається дифузія води у систему з більш високою концентрацією кінетично активних одиниць — молекул або іонів [6, 8].

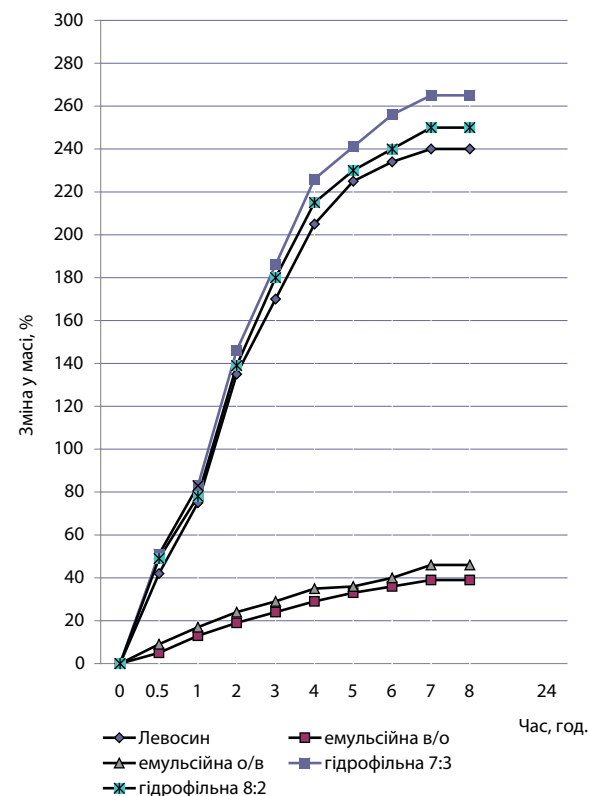
3.0 г (точна наважка) досліджуваної мазі поміщають у скляний циліндр, дном якого є напівпроникна мембрана. Цей циліндр, у свою чергу, розташовують у камері для діалізу із середовищем (вода або буферний розчин) таким чином, щоб мембрана була занурена у водне середовище на (2-5) мм. Циліндр із розчином і мембраною зважують до початку дослідження, а потім через певні відтинки часу до досягнення рівноваги, за якої припиняється поглинання води досліджуваним зразком. У ході експерименту об'єм середовища у камері підтримують на потрібному рівні. Із метою створення умов, подібних до живого організму, дослідження проводили при температурі (36 ± 1) °С, що підтримували за допомогою термостата ТС-80М-2. Точність показань температури в термостаті ± 0.5 °С. Зважування проводили з точністю до 0.01 г. Кількість адсорбованого середовища виражали у відсотках до вихідної маси наважки зразка [6, 7, 8].

Результати досліджень та їх обговорення

Кінетику абсорбції води зразками оцінювали за результатами маси поглинутої води через рівні відтинки часу.

Результати визначення осмотичної активності мазі на запропонованих основах наведені на Рисунку та в Табл. 2.

Рисунок 1



Кінетика абсорбції води маззю «Левосин» і досліджувальними зразками мазей на різних типах основ

Таблиця 2

Осмотична активність модельних систем за 8 годин

Тип основи	Сумарна зміна у масі, %
емульсійна типу в/о	39
емульсійна типу о/в	46
гідрофільна 7:3	250
гідрофільна 8:2	265
мазь «Левосин»	240

Примітка.
n=6.

Як видно з Рис. 1, та результатів, наведених у Табл. 2, найменшу осмотичну активність мають зразки, виготовлені на емульсійних типах основ. Найбільш виражену осмотичну активність мають зразки на гідрофільних основах, виготовлених на поліетиленоксидах різної молекулярної маси. Судячи з даних, наведених у Табл. 2, осмотична активність, виявлена в

емульсійних типах основ, не є достатньою для використання при лікуванні ранових запалень на першій стадії [1, 4, 14].

Гідрофільна основа зі співвідношенням ПЕО 1500 та ПЕО 400 7:3 має більш високу осмотичну активність, що, у свою чергу, може призвести до пересушування рани та пошкодження оточуючих тканин [1, 14].

Загальна маса абсорбованої води зразками, виготовленими на поліетилен оксидній основі зі співвідношенням ПЕО 8:2 і маззю «Левосин» становить 250 % і 240 %, відповідно. Це дозволило зробити висновок, що обраний склад мазі забезпечує рівень осмотичної дії, необхідний для мазей, що застосовуються у терапії ран у першій фазі ранового процесу.

Таким чином, на підставі проведених мікробіологічних біофармацевтичних досліджень для подальшого вивчення нами обрано гідрофільну мазеву основу зі співвідношенням ПЕО-1500 та ПЕО-400 8:2.

Висновки

Аналізуючи залежність осмотичної активності мазі від часу, можна зробити висновок, що мазь має виражену осмотичну активність у перші 6-7 годин, що потім переходить у помірну. Цей час є достатнім для очищення рани від ексудату та зняття запалення.

Результати проведених дослідів дають можливість зробити висновок, що за кінетику абсорбції води найбільш оптимальною мазевою основою є гідрофільна основа зі співвідношенням ПЕО 1500 та ПЕО 400 8:2. Препарат, створений на такій основі, буде найбільш повно поглинати ексудат, очищувати рану від некротичних тканин та усувати набряк без надмірного ушкодження тканин рани.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безуглая Е.П. Разработка и исследование препаратов для местного лечения ран в первой фазе раневого процесса: Дис. ... к.фарм.н. — Харьков, 1996. — 194 с.
2. Воловик Н.В. Влияние пропиленгликоля на реологические и биофармацевтические свойства гелей / Н.В. Воловик, Н.А. Ляпунов, А.А. Зинченко // Фармаком. — 2001. - № 4. — С. 18-23.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
4. Рана и раневая инфекция / Под ред. акад. АМН СССР проф. М.И. Кузина, проф. Б.М. Костюченко. — М.: Медицина, 1990. — С. 223-297.
5. Применение современных мазей при лечении гнойных процессов мягких тканей / В.В. Бойко, В.К. Логачев, Ю.И. Исаев и др. // Вісник фармації. - 2001. - № 3. - С. 151.
6. Значение осмотических свойств мазей при их использовании в медицинской практике / И.М. Перцев, Н.Н. Беркало, С.А. Гутора, В.В. Постольник // Вісник Фармації. — 2002. - №2 (30). - С. 7-10.
7. Основы для мазей пенных препаратов в аэрозольных упаковках с заданной осмотической активностью / Н.А. Ляпунов, В.С. Куликовский, Е.П. Безуглая, Л.С. Блатун и др. : Тезисы

докл. респ. науч. конф «Реализация научных достижений в практической фармации». - Х.; 1991. — С. 93-94.

8. Sahn D.E. The role of automation and molecular technology in antimicrobial susceptibility testing / D.E. Sahn // Clin. Microb. And Inf. - 2008. - Vol. 21 (1) - P. 37-56.

9. Sorgenfrey D. Effect of temperature and filler type on the degradation kinetics of effervescent tablets stored in imperfectly sealed foils / D. Sorgenfrey, A. Rau, A. Sakr // Pharm. Ind. - 1995. - Vol. 57. -№ 6. - P. 499-502.

10. Філімонова Н.І. Дослідження антимікробної активності ліпофільного екстракту бруньок тополі китайської у складі м'якої лікарської форми / Н.І. Філімонова, Д.А. Спиридонов, М.В. Рыбалкин // Фармаком — 2011. - № 1/2. - С. 45-47.

11. The United States Pharmacopoeia. USP 30/NF 25. — Rockville: United States Pharmacopoeial Convention Inc., 2007. — 3553 p.

12. Работы ГНЦАС по созданию, внедрению и стандартизации мягких лекарственных средств и суппозиториях / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Н.Г. Козлова и др. // Фармаком. — 1999. — № 3/4. — С. 61-64.

13. Etude du transport de principes actifs incorpores dans des emulsions liquides de type huile dans eau / A.S. Lugano. — Zurich, 1977. — 117 s.

14. Даценко Б.М. Теория и практика местного лечения гнойных ран / Б.М. Даценко. - К.: «Здоров'я», 1995. - 383 с.

Резюме

Філімонова Н.І., Спиридонов Д.А., Рыбалкин Н.В.

Исследование осмотической активности мази противомикробного действия для лечения раневого процесса на первой стадии

Приведены результаты экспериментального исследования осмотической активности мягкой лекарственной формы с липофильным экстрактом почек тополя китайского. Экспериментально установлено, что образцы мази на эмульсионной основе типа масло/вода (м/в) и вода/масло (в/м) имеют слабую осмотическую активность, в то время как образцы мази на гидрофильной основе имеют выраженную осмотическую активность. Результаты исследования позволяют создать мягкую лекарственную форму с растительным экстрактом, предназначенную для лечения инфекционных осложнений на первой стадии раневого процесса.

Summary

Filimonova N.I., Spiridonov D.A., Ribalkin N.V.

Study of osmotic effect of antimicrobial ointment for the treatment of the wound process at the first stage

Data of the experimental study of the osmotic effect of soft dosage form with lipophilic extract of *Populus simonii* Carr. buds were given. Experimentally established, that samples on the basis of emulsions of oil / water and water / oil types showed weak osmotic effect, while samples at the hydrophilic base had expressed osmotic activity. Data of the study allowed creating a semi-solid dosage form with the plant extract, which would be intended for the treatment of infectious complications in the first stage of the wound process.

Філімонова Наталія Ігорівна. Д.мед.н. (2004.). Професор (2006). Зав. кафедри вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (2008).

Спиридонов Дмитро Андрійович. Аспірант кафедри мікробіології, вірусології та імунології НФаУ (2008).

Рыбалкин Микола Вікторович. Аспірант кафедри мікробіології, вірусології та імунології НФаУ (2008).

Стандартизація лікарських засобів

УДК 615.31:547.792].014

Георгієвський Г.В., Мазур І.А.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»
Запорізький державний медичний університет

Будова та критичні показники якості субстанції лізинію

Із застосуванням комплексу фізико-хімічних методів встановлено будову нової лікарської субстанції лізинію та визначено критичні показники її якості. Методом ВЕРХ встановлено, що при утворенні молекули D,L-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату між лізином і 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтовою кислотою витримується співвідношення 1:1. Розроблено та валідовано методу кількісного визначення лізинію методом потенціометричного титрування у середовищі мурашина кислота безводна - оцтова кислота безводна (1:8).

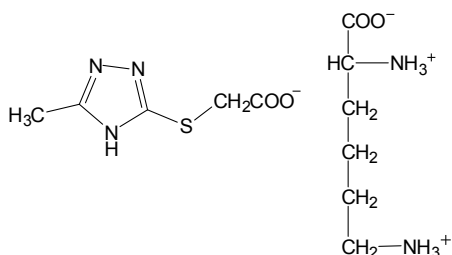
Колективом авторів під керівництвом професора Мазура І.А. створено ряд біологічно-активних сполук - похідних 1,2,4-триазолу, що знайшли широке застосування у лікарських формах як метаболічні препарати при лікуванні таких поширених захворювань, як патологія серцево-судинної системи, захворювання головного мозку [1, 2].

Відома біологічно активна сполука — морфоліній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, зареєстрована під назвою «тіотриазолін», що знайшла широке застосування переважно у відновлювальному періоді захворювань ЦНС, не виявляє позитивну дію відносно ендотеліоцитів мозкових судин [1, 2]. Тому було поставлено завдання створити нову біологічно активну сполуку, що не має цього недоліку [3-5].

Такою сполукою став D,L-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат — субстанція під умовною назвою «лізиній» (Рис. 1).

Метою даної роботи є встановлення будови та визначення критичних показників якості субстанції лізинію.

Рисунок 1



Структурна формула лізинію

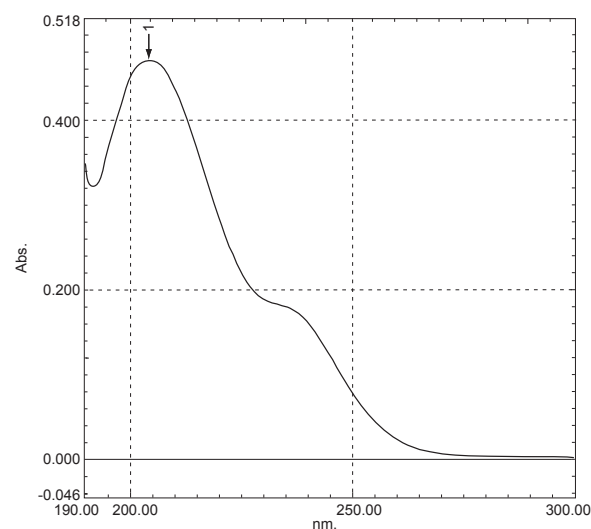
Будову лізинію встановлено за даними елементного аналізу. Комплексом фізико-хімічних методів встановлюють і контролюють критичні показники якості, вихід за межі яких веде до невідповідності якості лікарського засобу.

На Рис. 2, 3 наведено УФ-, ІЧ-спектри лізинію. Профіль технологічних домішок - про-

дуктів синтезу — встановлено методом ВЕРХ, наявність залишкових кількостей органічних розчинників — методом ГХ.

УФ-спектр знято у воді на приладі фірми «Shimadzu» (Японія). ІЧ- спектри знято у дисках KBr на приладі «Perkin-Elmer Spectrum One FTIR».

Рисунок 2

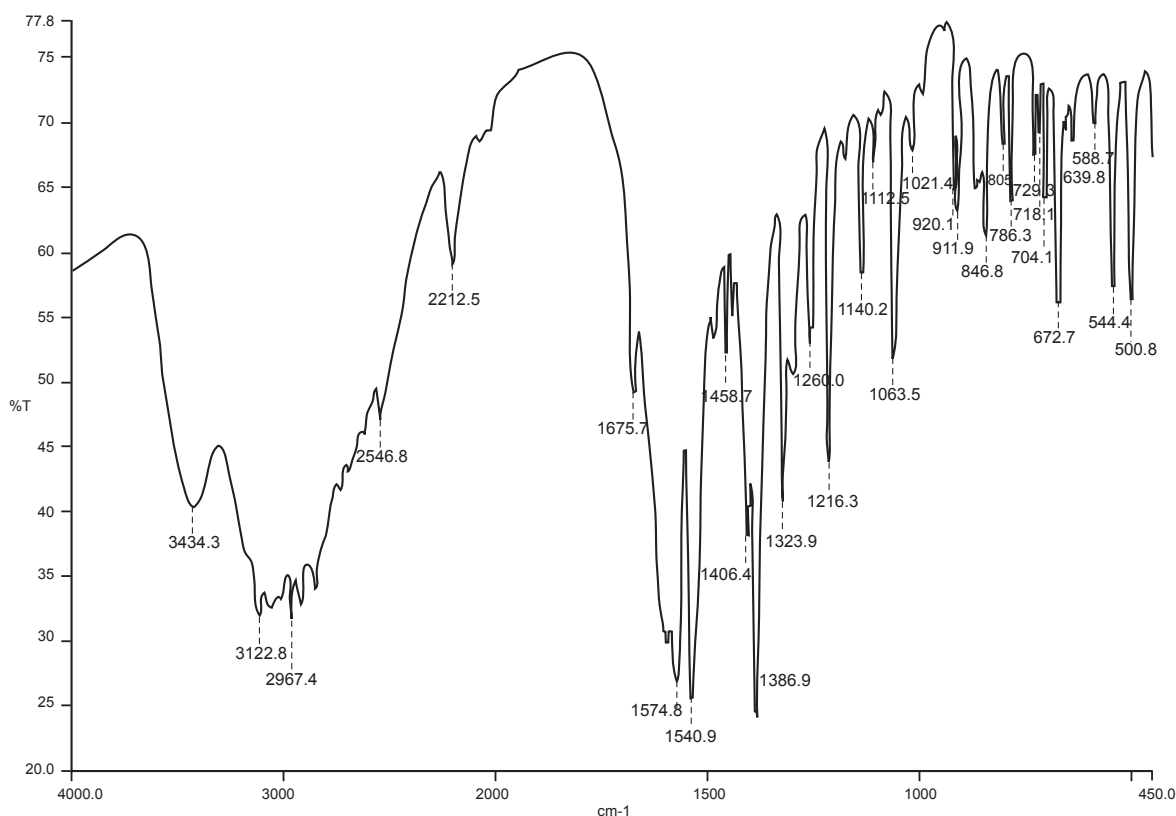


УФ-спектр лізинію у воді

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ у максимумі за довжини хвилі 204.5 нм становить 175.4.

Для доведення кількісного співвідношення 1:1 лізину та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти при утворенні молекули лізинію застосовано метод ВЕРХ. В якості стандартного зразка використовували субстанцію 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти (МТТА) із встановленим методом потенціометричного титрування у середовищі оцтової льодяної кислоти кількісним вмістом [6]. Наважку стандартного зразка (СЗ) МТТА розчиняли в 1 мл 30 % розчину аміаку та доводили об'єм сумішшю ацетонітрил - вода (1:1) до 50 мл. Одержан-

Рисунок 3



ІЧ-спектр лізинію у дисках КВr

ний розчин хроматографували та визначали площі піків.

Наважка МТТА 0.0313 г в 50 мл (вміст 99.58) %	Площа піка
	4977312
	5007024
	5007757
Середнє	5050877
	5010743

Наважку лізинію розчиняли у суміші ацетонітрил - вода (1:1) і доводили об'єм тією самою

сумішшю до 50 мл. Одержаний розчин хроматографували у таких умовах (Рис. 4, 5):

- колонка Resolv C18, розміром (300 × 4,6) мм, заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги випробування «Перевірка придатності хроматографічної системи»;
- рухома фаза: ацетонітрил – буферний розчин (20:980), дегазована будь-яким зручним способом;

Таблиця 1

Результати, одержані при визначенні співвідношення лізину та МТТА у субстанції лізинію

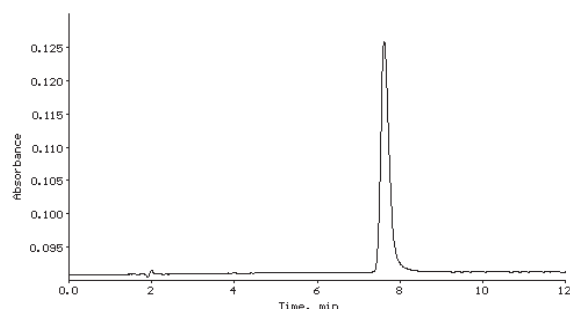
Наважка субстанції лізинію	Площа піка	Вміст МТТА у субстанції (г)	Число моль МТТА у субстанції	Число моль лізину у субстанції	Вміст лізину у субстанції (г)	Сумарно МТТА та лізину
0,0393 г в 50 мл; ВОДА = 0.08 %	3303210	0.0205	0.000119	0.000119	0.01733	0.03786
	3323882	0.0207	0.000119	0.000119	0.01743	0.03809
	3339000	0.0208	0.000120	0.000120	0.01751	0.03827
	3336824	0.0207	0.000120	0.000120	0.01750	0.03824
	3348566	0.0208	0.000120	0.000120	0.01756	0.03838
	середнє	0.0207			0.01747	0.03817
	% МТТА у субстанції		52.7			

швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв;
температура колонки: 30 °С;
детектування за довжини хвилі 254 нм.

Придатність хроматографічної системи:

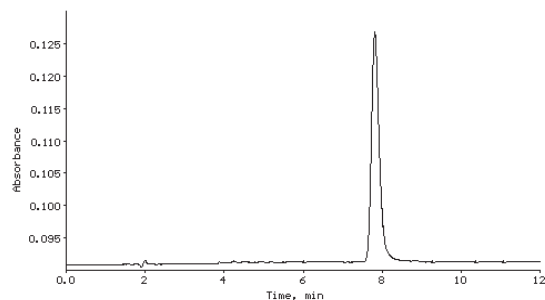
- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти, має становити не менше 2000 теоретичних тарілок;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піків 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти, має бути: 0.51 % для 2 паралельних визначень, 1.34 % для 3 паралельних визначень, 1.92 % для 4 паралельних визначень;
- коефіцієнт симетрії піка 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти має становити не більше 1.7 (згідно з вимогами ДФУ 2.2.46).

Рисунок 4



Хроматограма розчину МТТА

Рисунок 5



Хроматограма розчину субстанції

Як було зазначено вище, у субстанції лізинію кількість лізину у молярному співвідношенні має відповідати кількості МТТА. У табл. 1 наведено дані та розрахунки, які свідчать, що співвідношення лізину та МТТА у субстанції лізинію становить 1:1.

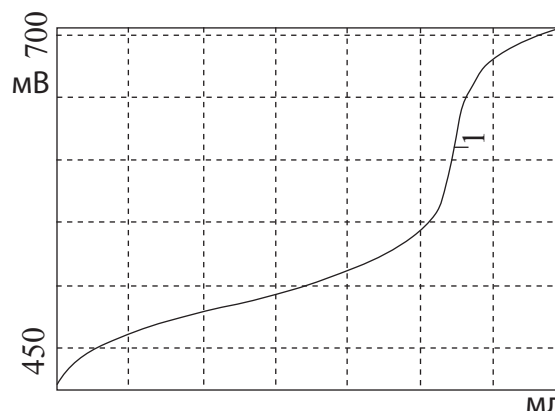
Таким чином, проведені дослідження показали, що для кількісного визначення основної діючої речовини субстанції лізинію доцільно використовувати метод титрування у неводних

розчинниках, що базується на даних кислотно-лужних властивостей похідних 1,2,4-триазолу, одержаних нами раніше [6-8].

Методика кількісного визначення лізинію

0.080 г субстанції розчиняють у 5 мл мурашиної кислоти безводної, додають 40 мл оцтової кислоти безводної та титрують 0.1 М розчином кислоти хлорної потенціометрично (ДФУ, 2.2.20), використовуючи систему скляного та хлорсрібного електродів (Рис. 6).

Рисунок 6



Крива потенціометричного титрування лізинію

1 мл 0.1 М розчину хлорної кислоти відповідає 10.65 мг $C_{11}H_{21}N_5O_4S$, вміст якого має становити (98.5-101.0) %.

Валідація методики

Валідацію методики кількісного визначення за характеристиками лінійність, правильність і прецизійність проведено відповідно до вимог ДФУ, а також згідно із науковими рекомендаціями [9, 10]. Усі розрахунки проведено у «нормалізованих» координатах.

Наведені вище характеристики вивчено для 9 наважок препарату в області ± 20 % від номінального вмісту.

Для оцінки правильності та прецизійності використовували всі результати, одержані при визначенні лінійності.

Повна невизначеність аналізу, у відсотках, виражається як однобічний довірчий інтервал для імовірності 95 %.

Вимоги до максимально припустимої невизначеності кількісного визначення лізинію:

$$\Delta_{Ass} \leq B = 1.0 \%,$$

де:

B — верхня межа вмісту, у відсотках.

Вимоги до прогнозованої невизначеності пробопідготовки

Рекомендується, щоб невизначеність пробопідготовки (Δ_{Sp}) була незначущою у порівнянні

з максимально припустимою невизначеністю результатів аналізу [11]:

$$\Delta_{Sp} \leq \Delta_{Ass} \times 0.32 = 1.0 \times 0.32 = 0.32 \%$$

Якщо дані вимоги не витримуються, проводять прогноз повної невизначеності аналізу. Прогнозована невизначеність не має перевищувати максимально припустиму невизначеність аналізу.

Лінійність, правильність і прецизійність

Титрували 9 наважок у діапазоні $\pm 20 \%$ від номінального вмісту. Наважку субстанції розчиняють у 5 мл мурашиної кислоти безводної, додають 40 мл оцтової кислоти безводної та титрують потенціометрично 0.1 М розчином хлорної кислоти в оцтовій кислоті безводній із використанням автоматичного титратора 702 SM Titrino, виробництва фірми «Metrohm», Швейцарія (об'єм бюретки 10 мл). Перед кількісним визначенням проводять встановлення титру 0.1 М розчину хлорної кислоти в оцтовій кислоті безводній. Для цього наважку калію гідрофталату розчиняють у суміші 5 мл мурашиної кислоти безводної та 40 мл оцтової кислоти безводної та титрують потенціометрично 0.1 М розчином хлорної кислоти в оцтовій кислоті безводній.

Усі подальші розрахунки проводили у нормалізованій системі координат: вміст виражається у відсотках від номінального вмісту (номінальна концентрація - C_{theor}); об'єм, витрачений на титрування для кожної з наважок препарату (V_i), виражається у відсотках від об'єму, що має бути витраченим на титрування теоретично (V_{theor}).

Методика має належну лінійність, правильність і прецизійність, якщо витримуються вимоги до критеріїв лінійності, правильності та прецизійності.

Лінійність

Вимоги до вільного члена a :

1. Критерій статистичної незначущості

Вільний член a має статистично незначуще відрізнятись від нуля, тобто не має перевищувати свій довірчий інтервал:

$$|a| \leq \Delta_a = t(95\%, n - 2) \times SD_a = 1.895 \times SD_a.$$

2. Критерій практичної незначущості

Якщо перший критерій не виконується, використовують критерій практичної незначущості для вільного члена:

$$|a| \leq \frac{0.32 \times \Delta_{As} (\%) }{1 - (80 / 100)} = 1.6.$$

Довірчий інтервал точок навколо прямої дорівнює добутку коефіцієнта Стьюдента на залишкове стандартне відхилення (RSD_{rest}) і не має перевищувати гранично допустимої невизначеності методики аналізу Δ_{As} (число ступенів свободи точок прямої дорівнює $f = 9 - 2 = 7$):

$$RSD_{rest} / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, 7)} = \frac{1.0}{1.895} = 0.53.$$

Концентрації, що досліджуються – 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 115 %, 120 % - характеризуються стандартним відхиленням $RSD_y = 13.69 \%$, що розраховують за формулою:

$$RSD_y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \cdot (g - 1)}} \times 100\%,$$

де:

C_i — концентрація i -ого розчину, у відсотках;

C_{cp} — середня концентрація розчинів, у відсотках;

g — обсяг вибірки (число точок прямої).

Для коефіцієнта кореляції мають виконуватися такі вимоги:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_y}\right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{0.53}{13.69}\right)^2} = 0.99926.$$

Прецизійність

Прецизійність методики оцінювали, використовуючи результати, одержані при вивченні лінійності.

Розраховували відношення введено/знайдено:

$$d_i = (C_i / C_{theor}) \times 100 / (V_i / V_{theor}).$$

Однобічний довірчий інтервал Δ_d не має перевищувати максимально припустиму невизначеність аналізу:

$$\Delta_d = S_{C,r} (\%) \times 1.859 \leq 1.0,$$

$$S_{C,r} (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=9} (d_i - \bar{d})^2}{8}},$$

де:

S_r — стандартне відхилення, у відсотках, розраховане для відношень введено/знайдено для 9 титрувань;

1.859 — однобічний критерій Стьюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи 8.

Правильність

Правильність методики оцінювали, використовуючи результати, одержані при вивчен-

ні лінійності, та характеризували за двома критеріями:

1. Критерій статистичної незначущості:

$$|\bar{d} - 100| \leq \frac{\Delta_d}{\sqrt{9}} = \frac{\Delta_d}{3}$$

2. Критерій практичної незначущості

Якщо дане вище співвідношення не виконується, використовували критерій незначущості цієї систематичної похибки у порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу:

$$|\bar{d} - 100| \leq 0.32 \cdot 1.0 = 0.32$$

Результати валідації

Розрахунок прогнозованої невизначеності пробопідготовки:

Операція пробопідготовки	Невизначеність, %
Наважка 0.080 г	0.25 %

$$\Delta_{sp} \leq 1.0 = \sqrt{0.25^2} = 0.25$$

Таким чином, невизначеність пробопідготовки (Δ_{sp}) кількісного визначення незначуща у порівнянні з максимально припустимою не-

значеністю аналізу, тому її не враховують при оцінці невизначеності результатів аналізу.

Повна невизначеність аналізу

Повну невизначеність аналізу (Δ) обчислюють за формулою:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{\Delta_{TitrHClO_4}^2 + \Delta_{Assay}^2}$$

Встановлення титру 0.1 М розчину хлорної кислоти за калієм гідрофталатом:

$m_{(нав)г}$	$V_{0.1M HClO_4}$, мл	C , моль/л	K
0.1042	5.090	0.10023	1.0022
0.1002	4.902	0.10009	
0.0983	4.797	0.10034	
0.1041	5.090	0.10023	

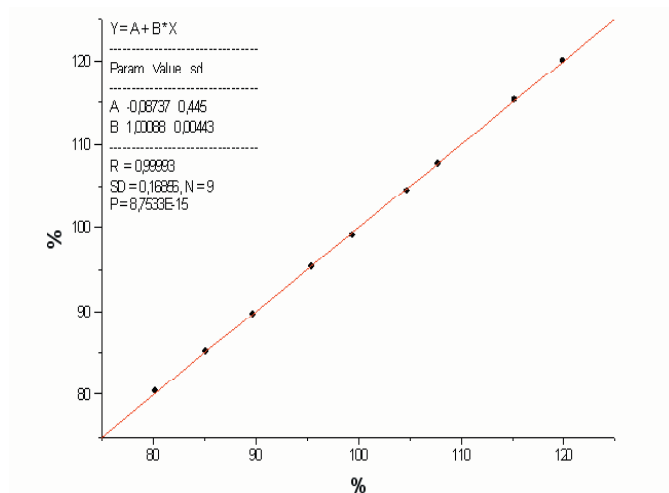
Примітка.

Титр установлюють безпосередньо перед використанням.

Кількісне визначення лізину:

$m_{(нав)}$, мг	$V_{0.1 M HClO_4}$, мл	%
72.1	6.730	99.6
76.7	7.155	99.6
79.9	7.436	99.3
84.2	7.838	99.4
86.6	8.076	99.5
середнє		99.5

Рисунок 7



Графік лінійної залежності $Y_i = b \times X_i + a$

Параметр	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Оцінка результатів
b	1.00088			
S_b	0.00443			
a	-0.08737	$ a \leq 0.843$	$ a \leq 1.6$	відповідає критерію практичної незначущості та критерію статистичної незначущості
S_a	0.445			
RSD_0	0.1686			
RSD_0/b	0.1685	≤ 0.53		відповідає
r	0.99993	≥ 0.99236		відповідає

Невизначеність встановлення титру 0,1 М розчину HClO₄, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\Delta_{Titr, HClO_4} = \frac{RSD \times t(95\%, f)}{\sqrt{n}}; \quad f = n - 1,$$

де:

RSD — відносне стандартне відхилення титрування при визначенні титру 0,1 М розчину HClO₄, у відсотках;

n — число паралельних визначень;

t — однобічний критерій Стьюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи f.

Невизначеність титрування субстанції, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\Delta_{Assay} = \frac{RSD \times t(95\%, f)}{\sqrt{n}}; \quad f = n - 1,$$

де:

RSD — відносне стандартне відхилення титрування, у відсотках;

n — число паралельних визначень;

t — однобічний критерій Стьюдента для імовірності 95% і числа ступенів свободи f.

Встановлення титру 0.1 М розчину HClO₄:

RSD, %	Δ_{Titr} , %
0.1022	0.1492

Титрування субстанції:

RSD, %	Δ_{Assay} %
0.1065	0.1015

Повна невизначеність аналізу:

Δ , %	Вимоги
0.1804	1.0

Таким чином, повна невизначеність кількісного визначення (Δ_{FAO}) незначуща у порівнянні з максимально припустимою невизначеністю.

Результати перевірки лінійності

Титрування субстанції: (Табл. 2).

Методом найменших квадратів розрахували лінійну залежність (Рис. 7):

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

де:

X_i — концентрація препарату, у відсотках від номінальної,

Y_i — об'єм титранту, у відсотках від теоретичного.

Таким чином, представлені розрахунки критеріїв лінійності та розраховані параметри лінійної залежності відповідають вимогам до критеріїв лінійності.

Результати перевірки правильності та прецизійності (Табл. 3).

Таким чином, розраховані параметри відповідають вимогам до критеріїв правильності та прецизійності.

Таблиця 2

наважка, мг	знайдено, мг	введено, мг	введено (%)	знайдено/введено, %	V, мл	$V \times 100\% / V_{(theor.)}$
64.5	64.2	64.2	80.2	100.04	6.019	80.3
68.4	68.2	68.1	85.1	100.21	6.388	85.2
72.1	71.8	71.7	89.7	100.08	6.730	89.7
76.7	76.4	76.3	95.4	100.11	7.155	95.4
79.9	79.4	79.5	99.4	99.87	7.436	99.1
84.2	83.7	83.8	104.7	99.91	7.838	104.5
86.6	86.2	86.2	107.7	100.04	8.076	107.7
92.6	92.3	92.1	115.2	100.18	8.651	115.3
96.4	96.2	95.9	119.9	100.29	9.009	120.1

Таблиця 3

Прецизійність	Параметр	Значення	Вимоги		Оцінка результатів
	Δ_d		0.25	$\leq 1,0$	
Правильність	Параметр	Значення	Критерій статистичної незначущості	Критерій практичної незначущості	Оцінка результатів
	$ d_{cp} - 100 $	0.081	≤ 0.085	$\leq 0,32$	відповідає першому та другому критеріям

Отже, проведена валідація підтвердила лінійність, правильність і прецизійність методики.

Визначення залишкових кількостей органічних розчинників (етанолу) у субстанції лізиній

Усі стадії синтезу, включаючи перекристалізацію лізинію, проходять в етанолі або в його суміші з водою.

Відповідно до Настанови із регламентації залишкових кількостей органічних розчинників (СНМ/ICH/293/95 – Guidelines for residual solvents) етанол належить до розчинників класу 3 – малотоксичні розчинники. Клас 3 розчинників має значення дозволеної добової дії (PDE) 50 мг/доба та більше, тобто критична межа концентрації етанолу у субстанції $\geq 0.5\%$ та не потребує обґрунтування.

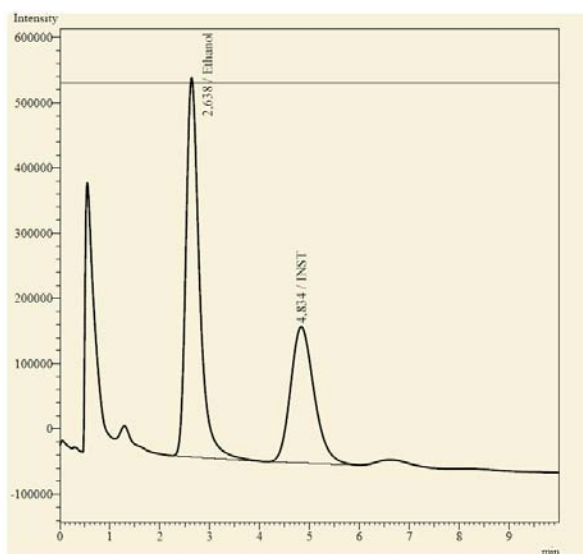
Визначення залишкових кількостей етанолу в субстанції лізинію проведено методом ГХ із використанням насадної колонки, заповненої полімерним сорбентом Порапак Q. Із метою максимального зменшення наважки субстанції застосовано метод безпосереднього введення у колонку водного розчину субстанції. Для зменшення похибки визначення через зміну об'ємів розчинів, що вводяться у хроматограф, застосовано метод «внутрішнього стандарту». Як внутрішній стандарт використано пропанол-1, пік якого на хроматограмах елюється за піком визначуваної речовини.

Типові хроматограми розчину порівняння етанолу та випробовуваного розчину представлено на Рис. 8, 9.

Методика визначення

Приготування випробовуваного розчину. Близько 50 мг субстанції поміщають у посудини

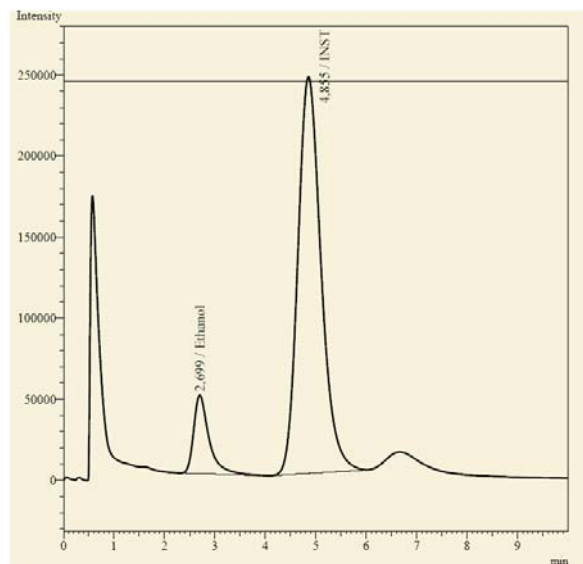
Рисунок 8



Хроматограма розчину порівняння етанолу

ну від автоматичного інжектора (віала) місткістю 1.5 мл, додають 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту та перемішують до повного розчинення.

Рисунок 9



Хроматограма випробовуваного розчину

Приготування розчину порівняння. 80 мл *води Р* поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають близько 500 мг (630 мкл) *етанолу Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішують.

У посудину від автоматичного інжектора (віала) місткістю 1.5 мл, поміщають 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту, додають мікрошприцом 50 мкл розчину порівняння та перемішують.

Приготування розчину внутрішнього стандарту. 80 мл *води Р* поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають близько 25 мг (32 мкл) пропанолу-1, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішують.

По 1 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння хроматографують на газовому хроматографі GC-2014 (фірма «Shimadzu», Японія) із полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка скляна, розміром 160 см \times 0.32 см, заповнена сорбентом Порапак Q із розміром частинок (60 – 80) меш або аналогічна;
- температура колонки — 175 °С;
- температура блока вводу проб — 190 °С;
- температура детектора — 220 °С;
- швидкість газу-носія — 35 мл/хв.

Вміст етанолу в субстанції, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{V_1 \times m_o \times 0.05 \times 100}{V_o \times m \times 100} = \frac{V_1 \times m_o \times 0.05}{V_o \times m}$$

де:

B_1 — середнє значення відношень площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту, розраховане із хроматограм випробовуваного розчину;

B_0 — середнє значення відношень площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту, розраховане із хроматограм розчину порівняння;

m_0 — маса наважки етанолу, у міліграмах;

m — маса наважки субстанції, у міліграмах.

Вміст етанолу у субстанції (Табл. 4) становить 0.042053, що не перевищує критичну межу 0.5 %.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо виконуються такі умови:

— ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком етанолу на хроматограмах розчину порівняння етанолу, має бути не менше 500 теоретичних тарілок (у нашому випадку — 533, 547, 554);

— відносне стандартне відхилення величин відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту, розраховане із хроматограм розчину порівняння, становить 0.756304, що відповідає вимогам [11];

— коефіцієнт розділення піків етанолу та внутрішнього стандарту, розрахований із хроматограм розчину порівняння етанолу, становить 3,216, 3,420 та 3,433, що є не менше 2.5.

Висновки

Із застосуванням комплексу фізико-хімічних методів (УФ-, ІЧ-спектрофотометрія та ВЕРХ) встановлено будову нової лікарської субстанції лізинію та визначено критичні показники її якості.

Методом ВЕРХ встановлено, що при утворенні молекули D,L-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату між лізином та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтовою кислотою витримується співвідношення 1:1.

Розроблено та валідовано методику кількісного визначення лізинію методом потенціометричного титрування у середовищі мурашина кислота безводна - оцтова кислота безводна (1:8).

ЛІТЕРАТУРА

1. Тиотриазолин. Фармакологические аспекты и клиническое применение / И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекман, Б.С. Зименьковский, В.Р. Стец. — Львов: Издательство «Наутилус», 2005. - 144 с.
2. Мазур И.А. Метаболические препараты / И.А. Мазур, И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев. — Запорожье, 2007. - 307 с.
3. Состояние энергетического метаболизма при церебральной ишемии и его модуляция производными L-лизина / А.А. Егоров, И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, Г.В. Георгиевский и др. // Український науково-практичний молодіжний журнал — 2011. - Спеціальний випуск. - С. 49-50.
4. Пат. 86668 Україна. Лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, що проявляє нейропротекторну, ноотропну, кардіопротекторну, ендотекторну, протиішемічну, антиоксидантну, протизапальну, протигіпоксичну дії та є малотоксичним: Пат. 86668 Україна І.А. Мазур, І.Ф. Беленічев, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Л.І. Кучеренко, М.А. Волошин, І.С. Чекман, В.І. Мамчур, Н.А. Горчакова, Г.В. Георгієвський, Т.А. Грошовий. — Заявл. 25.02.2009; Опубл. 12.05.2009, Бюл. № 9 — 10 с.
5. Пат. на корисну модель 59061 Україна. Лікарський засіб для лікування захворювань серцево-судинної та нервової системи, який проявляє протиішемічну, ендотекторну, антиоксидантну, протигіпоксичну, протизапальну дію: Пат. 59061 Україна І.А. Мазур, І.Ф. Беленічев, Ю.М. Колесник, Л.І. Кучеренко, С.В. Павлов, А.В. Абрамов, В.І. Мамчур, К.О. Кравченко, І.С. Чекман, Н.А. Горчакова, М.І. Завгородній, Г.В. Георгієвський. - Опубл. 10.05.2011, Бюл. № 9 - 6 с.
6. Георгиевский Г.В. Обоснование проведения анализа производных 1,2,4 – триазола при кислотно-основном титровании в неводных средах / Г.В. Георгиевский // Фармаком. — 2008. - № 4. - С. 60-65.

Таблиця 4

Розрахунок результатів аналізу

Зразок	Площа піка етанолу (S_i)	Площа піків внутрішнього стандарту (S_{inst})	Відношення площ $B = S_i/S_{inst}$		С етанолу, %
розчин порівняння	10953220	6830657	1.603538		
	10207289	6293059	1.621992		
	10245766	6298593	1.626675		
			4.852205	$B_0 = 1.617402$	
випробовуваний розчин	1289359	9271273	0.13907		X = 0.042053
	1025816	7814637	0.131269		
			0.270339	$B_i = 0.135169$	
маса наважки субстанції	50.1 мг				
маса наважки етанолу	504.2 мг				

7. Георгиевский Г.В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов производных 1,2,4-триазола / Г.В. Георгиевский // Запорізький медичний журнал. — 2010. - С. 58-70.

8. Георгиевский Г.В. Установление оптимальных условий кислотно-основного титрования новых отечественных препаратов тиотриазолина и кардиотрила по данным рКт / Г.В. Георгиевский. А.Г. Верушкин // Труды научно-практической конференции «Качество и безопасность. Стандарты и тенденции развития современного химического анализа веществ и материалов». - Одесса: Издательство ГП «Одесса-стандартметрология», 2010. - С. 67-73.

9. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, С.О. Чикалова, А.Г. Верушкин, В.П. Георгиевский // Фармаком. — 2009. - № 2. - С. 5-29.

10. Чикалова С.О. Оценка неопределенности методик титрования субстанций с использованием пошагового подхода / С.О. Чикалова, А.И. Гризодуб // Фармаком. — 2011. - № 3. - С. 11-31.

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

Резюме

Георгиевский Г.В., Мазур И.А.

Строение и критические показатели качества субстанции лизиния

С использованием комплекса физико-химических методов установлено строение новой лекарственной субстанции лизиния и определены критические показатели ее качества. Методом ВЕЖХ установлено, что при обра-

зовании молекулы D,L-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата между лизином и 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислотой выдерживается соотношение 1:1. Разработана и валидована методика количественного определения лизиния методом потенциометрического титрования в среде муравьиная кислота безводная - уксусная кислота безводная (1:8).

Summary

Georgiyevskiy G.V., Mazur I.A.

Structure and critical quality indices of lisiinium

By complex physical and chemical methods the structure of the new substance lisiinium was established and critical quality indices were determined. By HPLC was determined that during the synthesis of D,L-lisiinium-3-methyl-1,2,4-triazolil-5-tioacetate between lysine and 3-methyl-1,2,4-triazolil-5-tioacetic acid the ratio 1:1 was kept. The method of assay of lisiinium by potentiometric titration in a medium of formic acid anhydrous and acetic acid anhydrous (1:8) was developed and validated.

Георгієвський Геннадій Вікторович (н. 1969). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1992). К.фарм.н. (1995). Ст. наук. співр. Керівник наукового напрямку "Екстемпоральні лікарські засоби" відділу ДФУ державного підприємства «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Мазур Іван Антнович. Д.фарм.н. Професор. Засл. діяч науки та техніки України. Зав. кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.

УДК 543.06:664-035.67

Котов А.Г, Леонтьев Д.А, Леонтьев Д.Д., Гризодуб А.И.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Разработка методологии выбора метода анализа для идентификации пищевых красителей

Изучена возможность идентификации некоторых пищевых красителей методами УФ-спектрофотометрии, ТСХ, ВЭЖХ и специфическими качественными реакциями. Показана перспективность дифференциального подхода к выбору метода в зависимости от качественного и количественного состава смеси красителей при разработке методик контроля качества. Предложен алгоритм выбора методов анализа для идентификации красителей различной природы.

Пищевые красители (ПК) — группа природных или синтетических красителей, пригодных для окрашивания пищевых продуктов [1], а в последнее время и лекарственных средств (ЛС) и/или оболочек ЛС. Однако, если ПК добавляются к пищевым продуктам для восстановления природной окраски, повышения ее интенсивности и окрашивания бесцветных продуктов (напитков, мороженого и др.), а также для придания продуктам привлекательного вида и цветового разнообразия, то для ЛС приемлемо только последнее. Одним из основных требований к пищевым красителям, применяемым как в пищевой промышленности, так и фармацевти-

ческой, является безвредность в применяемых дозах, в том числе отсутствие канцерогенности, мутагенности, ярко выраженной биологической активности. Каждому из красителей присваивается идентификационный номер в ЕС, имеющий вид E 1__ __, который подтверждает, что красители соответствуют критериям, указанным в спецификациях JECFA (объединенный экспертный комитет WHO/FAO по пищевым добавкам). На сегодняшний день в Украине разрешено к применению в ЛС 45 красителей (E 100-175), по международным стандартам являющихся безопасными [2].

Согласно [3] «следует предоставить описание готового лекарственного средства и его состав. Информация должна включать описание лекарственной формы и состава, включающего все компоненты готового лекарственного средства, их количество, выраженное на единицу дозы, действие компонентов:

- действующего(-их) вещества(-в) ;
- вспомогательного(-ых) вещества(-в) независимо от его(их) происхождения или используемого количества, включая красители, консерванты, адъюванты, стабилизаторы, сгустители, эмульгаторы, вкусовые и ароматические вещества и т.д.;
- составных веществ оболочек лекарственных средств, предназначенных для внутреннего применения или какого-либо другого пути введения пациенту (твердые капсулы, мягкие капсулы, капсулы для ректального введения, таблетки, покрытые оболочкой, таблетки, покрытые пленкой, и т.д.)».

Кроме того, по каждому вспомогательному веществу должны быть подробно предоставлены спецификации и их обоснование. Необходимо описать и должным образом валидировать аналитические методики [3].

В Украине действует приказ, согласно которому в регистрационных материалах на лекарственное средство должны присутствовать сведения о качественных и количественных характеристиках всех составных веществ лекарственного препарата [4]. В частности, в Приложении 4 к пункту 6.1 Порядка проведения экспертизы материалов на лекарственные средства, которые подаются на государственную регистрацию (перерегистрацию), а также экспертизы материалов о внесении изменений в регистрационные материалы на протяжении действия регистрационного свидетельства, в пункте Е «Методы контроля готового лекарственного средства (контрольные испытания готовой продукции)», указано, что вспомогательные вещества настолько, насколько это необходимо, подвергаются тестам на тождественность. Предлагаемые методики определения тождественности красителей должны дать возможность установить их соответствие перечню красителей, приведенному в приложении к Директиве Совета 78/25/ЕЕС [4].

За рубежом для разделения и идентификации пищевых красителей применяются электрохимические методы анализа (электрофорез, полярография), хроматографические методы (ВЭЖХ, ТСХ), а также методы, основанные на фиксации электромагнитного и корпускулярного излучения [5, 6, 7, 8]. Методик идентификации

красителей методом УФ-спектрофотометрии в доступной нам литературе найдено не было, хотя в литературных данных имеются сведения о максимумах поглощения органических пищевых красителей [8, 9, 10, 11, 12], а также, в литературе описано использование метода УФ-спектрофотометрии для определения чистоты красителя как индивидуального вещества (субстанции) [9, 10, 11, 12]. Наиболее широко используются методы ВЭЖХ и ТСХ. К сожалению, на сегодняшний день, в Украине не существует утвержденных методик идентификации пищевых красителей в ГЛС и оболочках лекарственных средств.

Исходя из всего вышесказанного, в Украине актуальной становится задача по разработке методик для идентификации пищевых красителей в лекарственных средствах и оболочках лекарственных средств.

Целью данной работы является обоснование критериев выбора методов идентификации пищевых красителей, имеющих различную природу, при их совместном присутствии в анализируемом объекте, и с учетом соотношения концентраций красителей.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы следующие, наиболее часто встречающиеся в фармацевтической промышленности, пищевые красители:

Хинолиновый жёлтый (Quinoline Yellow, Acid Yellow 3, E104),

Жёлтый «Солнечный закат» FCF (Оранжево-жёлтый S, Sunset Yellow FCF, Orange Yellow S, E110),

Азорубин (Кармуазин, Azorubine, Carmoisine, E122),

Понсо 4R (Пунцовый 4R, кошенилевый красный A, Ponceau 4R, Cochineal Red A, E124),

Эритрозин (Erythrosine, E127),

Красный очаровательный AC (Allura Red AC, Allura Red, Food Red 17, FD&C Red 40, E129),

Индигодин (Индигокармин, Indigotine, Indigo carmine, E132),

Синий блестящий FCF (Brilliant Blue FCF, FD&C Blue No.1, D&C Blue No.4, Acid Blue 9, Alzen Food Blue No.1, Atracid Blue FG, Erioglaucine, Eriosity blue, Patent Blue AR, Xylene Blue VSG, бриллиантовый голубой FCF, бриллиантовый синий, E133),

Сахарный колер IV, полученный по «аммиачно-сульфитной» технологии (Sulphite Ammonia Caramel, E150d),

Диоксид титана (Titanium dioxide, двуокись титана, титановые белила, E171),

Таблица 1

Исследованные пищевые красители

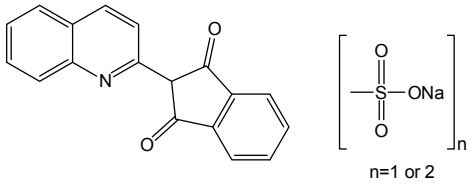
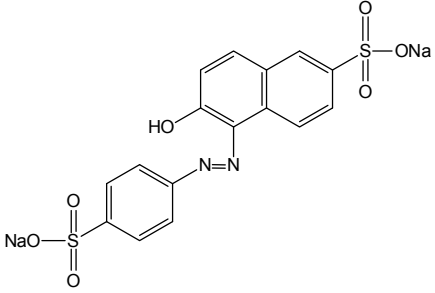
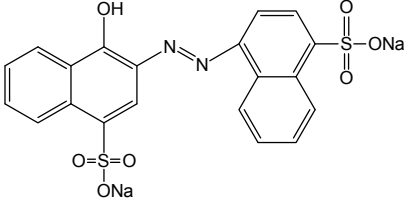
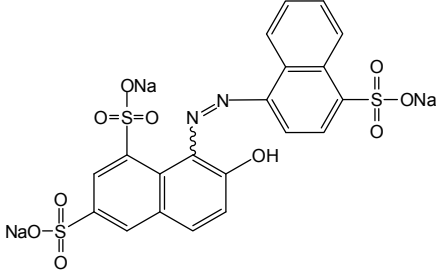
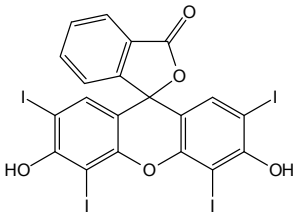
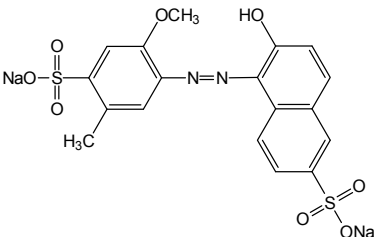
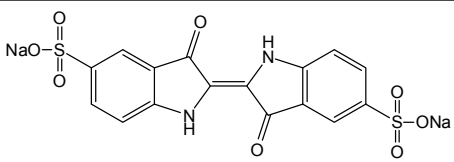
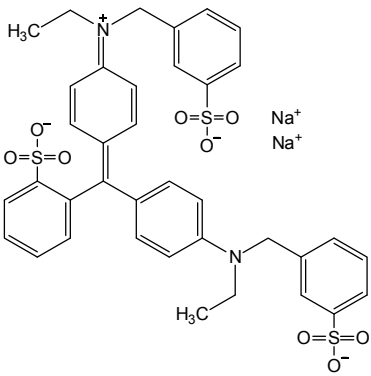
Наименование красителя	Структурная формула	Молекулярная масса	Содержание*
Желтый хинолиновый E104		273.29	≥98 % Sigma
Желтый «Солнечный закат» E110		452.37	90% Aldrich
Кармуазин E122		502.43	≥98.0% (HPLC) Aldrich
Понсо 4R E124		604.47	≥99.0% (HPLC) Fluka
Эритрозин E127		835.89	≥90% Sigma-Aldrich
Красный «Очаровательный» E129		496.42	≥98.0% (HPLC) Fluka
Индигокармин E132		466.35	≥98.0% (HPLC) Fluka

Таблица 1 (продолжение)

Наименование красителя	Структурная формула	Молекулярная масса	Содержание*
Синий блестящий FCF E133		792.85	≥90% Sigma-Aldrich
Сахарный колер IV E150d	Представляет собой краситель с неспецифическим компонентным составом	—	Nigay S.A.
Диоксид титана E171	TiO ₂	79.87	≥99% Sial
Оксиды железа (II) E172	FeO	71.84	≥98% Aldrich
Оксиды железа (III) E172	Fe ₂ O ₃	159.69	≥98% Fluka
Оксиды железа (II, III) E172	FeO·Fe ₂ O ₃	231.53	≥98% Aldrich

Примечание.

* — согласно сертификатам производителей.

Оксиды железа(II) (Iron oxides, E172),
Оксиды железа(III) (Iron oxides, E172),
Оксиды железа(II, III) (Iron oxides, E172).

Более подробные данные по исследованным красителям представлены в Табл. 1.

Оборудование, посуда и реактивы соответствовали требованиям ГФУ [13]:

- весы Sartorius MC 210S № 50710475,
- спектрофотометр UV-VIS HP 8453 № DE 60400817,
- хроматограф жидкостный «Waters 2690 Alliance» № WATO 270800 с диодноматричным детектором; программное обеспечение Millennium®, версия 3.15,
- колонка Waters SymmetryShield RP18, 250×4.6 mm, 5 μm, cat. No 186000113, Lot No. T41111,
- ТСХ-пластины со слоем силикагеля P [13, 14] (с размером частиц от 5мкм до 40 мкм):
- ТСХ пластины Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ,
- ТСХ пластины ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄,
- ТСХ пластины MERCK Silica gel 60 F₂₅₄,
- мерная посуда класса А,
- этанол (96 %) P,
- вода P,
- аммиака раствор концентрированный P,
- пропанол P,

- этилацетат P,
- уксусная кислота безводная P
- 2-бутанол P1.

Краткий обзор методов анализа красителей

Согласно литературным данным концентрация красителей в лекарственных средствах (ЛС) и/или оболочках ЛС колеблется в пределах от 0.003 % до 2 %, в зависимости от типа красителя, индекса показателя цвета и других факторов [2].

Анализ литературных данных по использованию красителей в фармацевтической промышленности, показал, что их можно поделить на две группы — органические красители, обладающие сложной структурой, и неорганические, представляющие собой простые вещества (в основном, оксиды). При идентификации неорганических красителей (например, железа(II) оксид, железа(III) оксид, титана диоксид), ввиду их специфического элементного состава в исследуемом образце, можно использовать селективные реакции на эти соединения либо их ионы. Органические красители, в свою очередь, можно разделить на красители — индивидуальные вещества и красители с неспецифическим компонентным составом,

например краситель карамель E150, который получают методом термической деструкции сахаров. Для идентификации органических красителей с индивидуальными веществами, структура и элементный состав которых могут быть близки к, например, действующим веществам лекарственного средства, целесообразно использовать методы ВЭЖХ, ТСХ и УФ-спектрофотометрии. Для идентификации органических красителей с неспецифическим компонентным составом могут использоваться все вышеперечисленные методы, а также идентификации по специфическим реакциям, основанные на специфических свойствах компонентов таких красителей.

Идентификация по селективным реакциям. Если в составе красителя находится более не встречающийся в остальных составляющих элемент либо ион, методом идентификации данного красителя может быть метод определения данного элемента в ЛС/оболочке ЛС реакцией с реагентом, который селективно показывает присутствие данного элемента/иона.

Метод УФ-спектрофотометрии. Органические красители, применяемые в лекарственных средствах и их оболочках, хорошо растворимы как в воде, так и в этиловом спирте. Полученные растворы красителей представляют собой прозрачные окрашенные жидкости, следовательно, могут быть идентифицированы методом УФ-спектрофотометрии. Потенциально, селективность и чувствительность метода могут быть оптимизированы за счет создания необходимого значения рН растворов, а также других приемов, используемых в УФ-спектрофотометрии.

Метод ТСХ. В настоящее время широко используемым методом идентификации органических соединений, к которым также относятся и красители, является ТСХ. Так как данный метод не требует больших затрат, а в случае с красителями — и проявляющих агентов, использование его является актуальным. Для разделения и идентификации пищевых красителей органического происхождения нами была использована методика для разделения красителей, применяемых в пищевой промышленности России [8].

Метод ВЭЖХ. В случае недостаточной чувствительности метода ТСХ (малые концентрации органических красителей в исследуемом объекте) и недостаточного разделения (наложения спектров в случае метода СФ, недостаточное разделение пятен методом ТСХ) смеси красителей, может быть использован метод ВЭЖХ, ввиду того, что он сохраняет как и чувствитель-

ность УФ-спектрофотометрии, так и селективность хроматографических методов.

Идентификация по неспецифическим компонентам органического красителя. Такие методы, также называемые групповыми идентифицирующими реакциями, могут быть использованы для идентификации органических красителей с неспецифическим компонентным составом, в случае, если в ЛС/оболочке ЛС не встречается других компонентов, дающих положительный отклик.

Преимуществом ВЭЖХ является одновременно высокая чувствительность и селективность, однако ее недостатками являются: использование сложного и дорогого оборудования; более длительное время проведения анализа; большой, по сравнению с ТСХ, расход растворителей и более жесткие требования к их чистоте. Преимуществами методов ТСХ и УФ-спектрофотометрии являются простота аппаратного оформления методик, экспрессность выполнения, более экономный расход растворителей.

На практике часто встречаются случаи, когда в исследуемых объектах одновременно присутствуют несколько красителей, в том числе и разных типов, поэтому специфичность методики по отношению к набору красителей, является чрезвычайно важным практическим вопросом.

Потенциально для органических красителей — индивидуальных веществ, растворимых в спирте этиловом, чувствительность может быть повышена концентрированием пробы упариванием (требует индивидуального подбора условий пробоподготовки). Для ВЭЖХ снижение предела обнаружения в обращенно-фазовом режиме может быть обеспечено увеличением объема пробы, особенно для водорастворимых красителей. Например, если «стандартный» объем пробы составляет (10-20) мкл., то для «стандартного» шприца автосамплера объем пробы может быть увеличен до 100 мкл (увеличение чувствительности в (5-10) раз).

Для органических красителей с неспецифическим составом проблемы с чувствительностью не возникает, так как необходимая концентрация красителя обычно легко достигается подбором соответствующей пробоподготовки.

Для неорганических красителей проблема с чувствительностью также обычно не возникает. Для титана диоксида проводится предварительное сжигание пробы, и концентрация титана диоксида подбирается объемом сжигаемой пробы. При этом присутствие железа оксидов не мешает определению титана диоксида.

Железа оксиды обычно отделяются фильтрованием, т.е. также имеется возможность концентрирования до необходимой степени, при этом присутствие титана диоксида не мешает определению оксидов железа.

Результаты исследований и их обсуждение

1. Метод УФ-спектрофотометрии. В результате эксперимента были получены данные, представленные в Табл. 2. На Рис. 1-8 приведены УФ-спектры растворов органических пищевых красителей. Концентрация растворов красителей — 0.02 мг/мл.

Различия в максимумах спектров полученных экспериментальных данных и литературных данных может быть связано с тем, что в литературных данных не указан растворитель, в котором проводили измерения.

Для красителя E122 в литературных данных приведен только максимум в ультрафиолетовом диапазоне. С нашей точки зрения для идентификации красителей более информативными являются максимумы поглощения в видимом диапазоне. В связи с этим в Табл. 2 приведены длинноволновые максимумы, полученные нами экспериментально.

На основании приведенных выше данных, можно сказать, что для данных красителей методика обладает удовлетворительной селективностью. УФ-спектры испытуемых растворов органических пищевых красителей обладают достаточной индивидуальностью, что может быть использовано для их идентификации. Однако, исходя из полученных результатов, ввиду близости максимумов поглощения и пологости спектров поглощения, могут возникать сложности с совместным определением следующих пар красителей: индигокармин E132 — синий блестящий FCF E133; понсо 4R E124 — красный «очаровательный» E129. В случае совместного

определения таких пар красителей более целесообразно использовать другие методы идентификации.

2. Метод ТСХ. В методике, которая применяется для разделения красителей, применяемых в пищевой промышленности России [8], предложены два состава подвижной фазы (ПФ) для ТСХ (Табл. 3). Для эксперимента была выбрана ПФ А, как обладающая большей разделяющей способностью (ПФ Б, например, неселективна в случае пары кармуазин E122 - понсо 4R E124, Табл. 4).

Таблица 3

Состав подвижных фаз для ТСХ (мл)

Компонент ПФ [9]	ПФ А	ПФ Б
пропанол Р	100	0
этилацетат Р	30	0
вода Р	30	20
аммиака раствор концентрированный Р	1	0
уксусная кислота безводная Р	0	20
2-бутанол Р1	0	50

В результате эксперимента были получены данные, представленные в Табл. 4. На Рис. 9, 10 приведены типичные хроматограммы органических пищевых красителей. Концентрация спиртовых растворов красителей составляла 0.1 мг/мл. Наносимый объем — 15 мкл, для красителя желтый хинолиновый E104 — 30 мкл. Количество наносимого вещества подобрано таким образом, чтобы при визуальной оценке пятно красителя было отчетливо видно («предел обнаружения»× 3).

Краситель E104 на хроматограмме ТСХ имеет две зоны, поскольку в состав красителя входят 2 вещества с различной степенью сульфатирования (Табл. 1).

Таблица 2

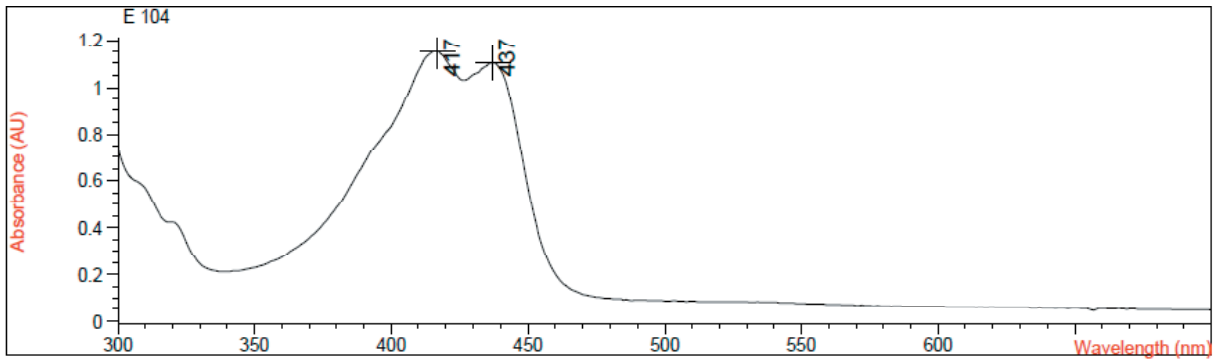
Максимумы поглощения органических пищевых красителей

Наименование красителя	Максимумы согласно [8], растворитель не указан, нм	Экспериментальные данные (вода)	
		максимумы поглощения в области (300-650) нм	удельный показатель поглощения (E_1^1)
желтый хинолиновый E104	412	417 нм; 437 нм *	564
желтый «Солнечный закат» E110	484	482 нм	487.6
кармуазин E122	228	324 нм, 519 нм*	260.3
понсо 4R E124	502	334 нм, 513 нм*	204.8
эритрозин E127	525	316 нм, 535 нм*	745.7
красный «Очаровательный» E129	500	316 нм, 510 нм*	698.3
индигокармин E132	610	610	195.7
синий блестящий FCF E133	630	626	456

Примечание.

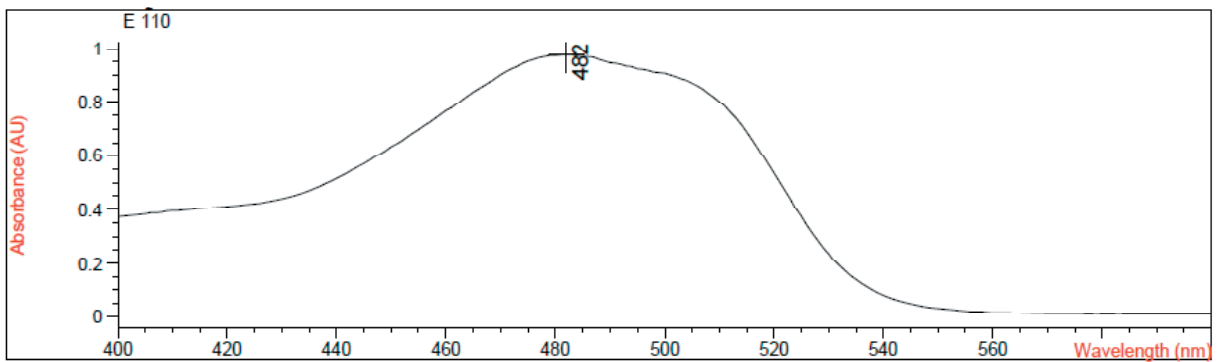
* — спектр поглощения имеет два максимума.

Рисунок 1



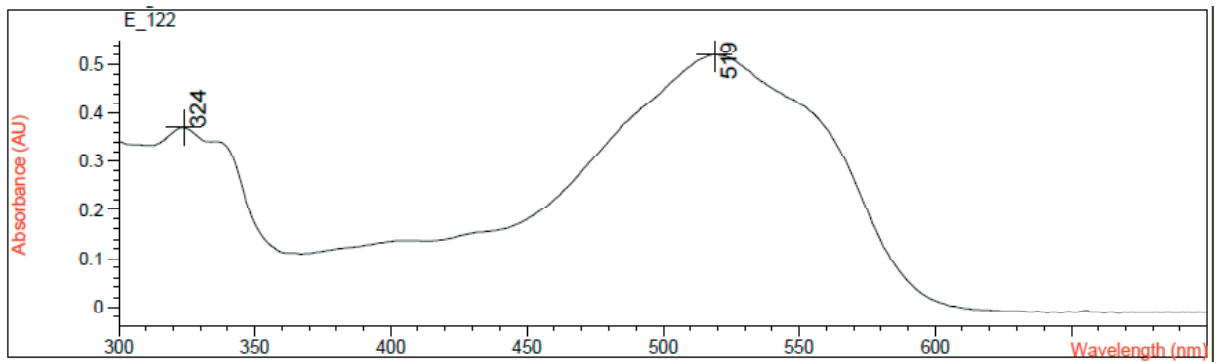
УФ-спектр раствора красителя E 104

Рисунок 2



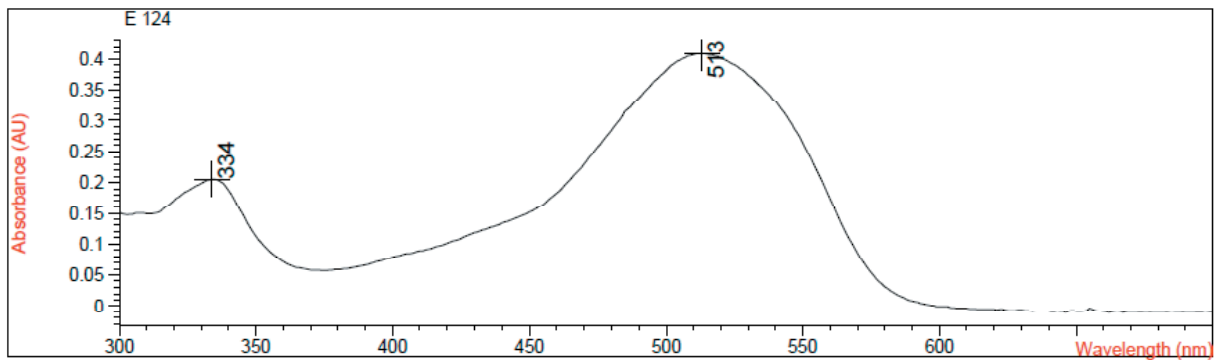
УФ-спектр раствора красителя E 110

Рисунок 3



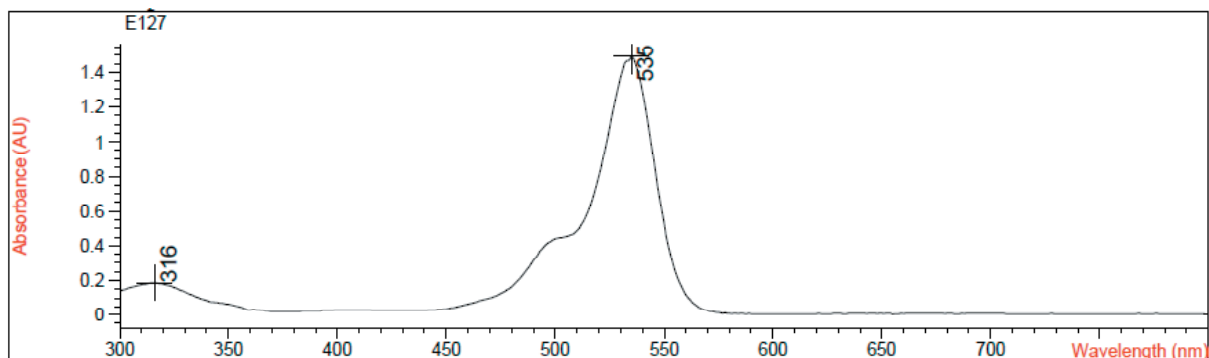
УФ-спектр раствора красителя E 122

Рисунок 4



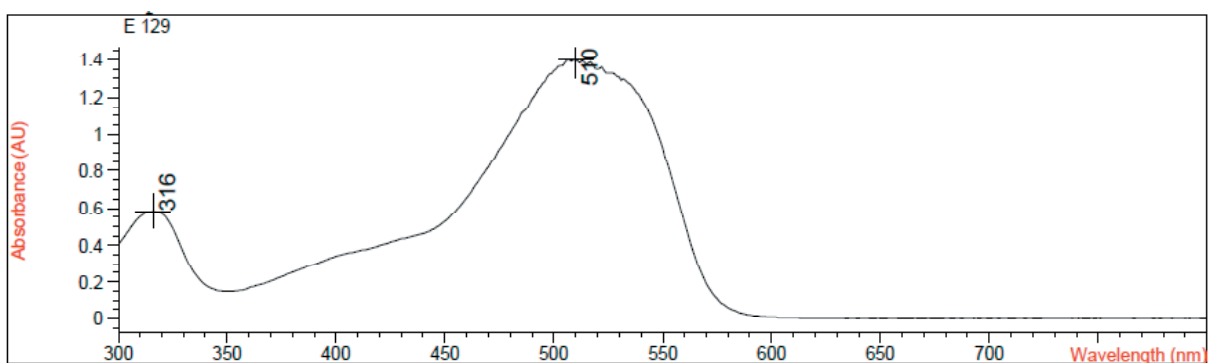
УФ-спектр раствора красителя E 124

Рисунок 5



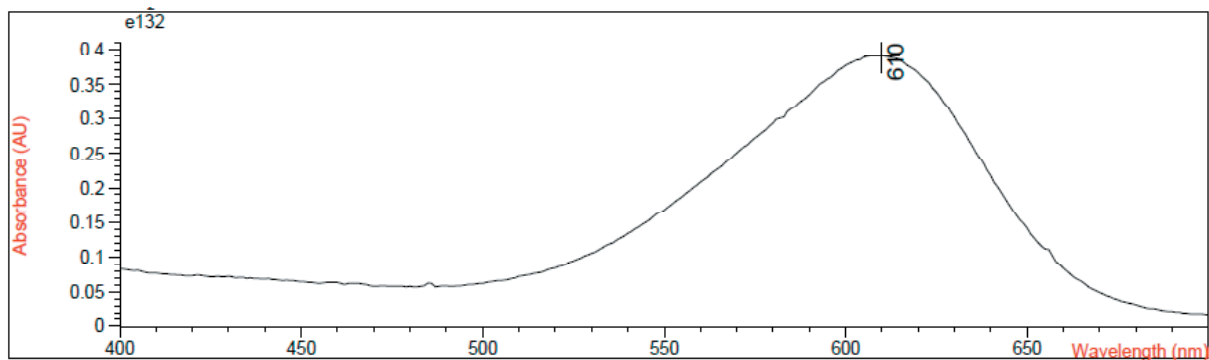
УФ-спектр раствора красителя E 127

Рисунок 6



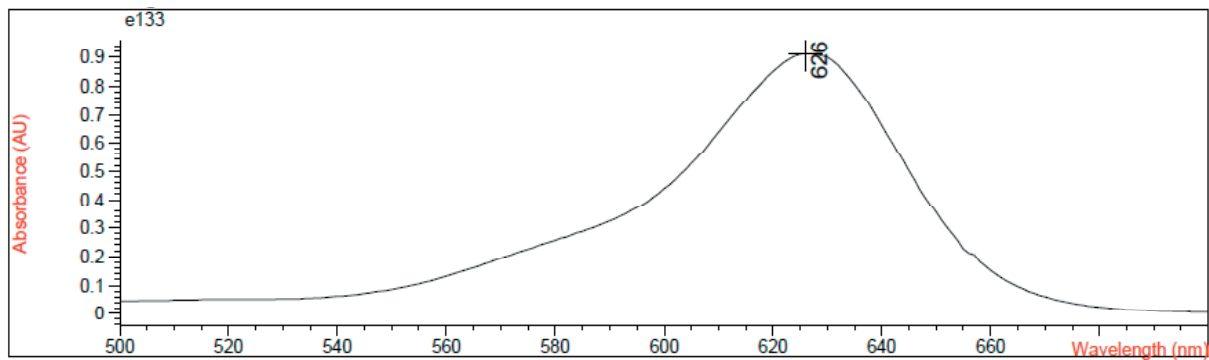
УФ-спектр раствора красителя E 129

Рисунок 7



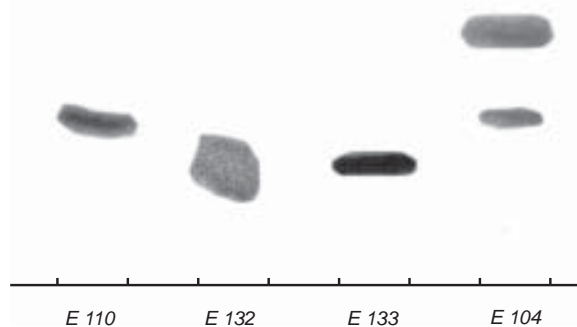
УФ-спектр раствора красителя E 132

Рисунок 8



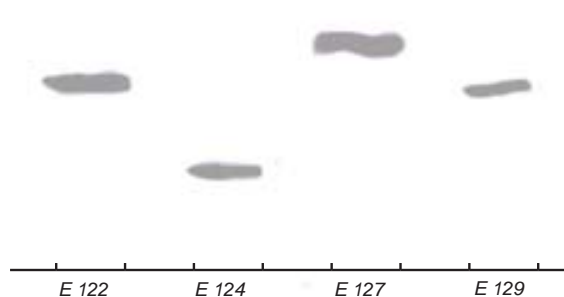
УФ-спектр раствора красителя E 133

Рисунок 9



Типичные хроматограммы органических пищевых красителей E104, E110 E 132 и E133 в ПФ А

Рисунок 10



Типичные хроматограммы органических пищевых красителей E122, E124, E127 и E129 в ПФ А

На основании данных Табл. 4, а также Рис. 9, 10 можно сделать вывод, что для части органических пищевых красителей селективность методики достаточная. Так, методика позволяет разделить такие органические красители, как желтый хинолиновый E104, синий блестящий FCF E133, понсо 4R E124, красный «Очаровательный» E129. Недостаточное разделение наблюдается для пар: желтый хинолиновый E104 — желтый «Солнечный закат» E110;

Таблица 4

Величины R_f органических пищевых красителей в различных подвижных фазах

Наименование красителя	Величины R_f согласно [8]		Экспериментальные данные, ПФ А
	ПФ А	ПФ В	
желтый хинолиновый E104		0.56	0.80; 0.63*
желтый «Солнечный закат» E110	0.690	0.57	0.65
кармуазин E122	0.78	0.51	0.78
понсо 4R E124	0.57	0.51	0.42
эритрозин E127		0.97	0.85; 0.75*
красный «Очаровательный» E129			0.74
индигокармин E132	0.71	0.26	нет четкой зоны
синий блестящий FCF E133		0.5	0.40

Примечание.

* — на хроматограмме красителя найдено несколько зон, R_f указаны в порядке уменьшения их интенсивности.

кармуазин E122 — эритрозин E127; понсо 4R E124 — синий блестящий FCF E133. В случае совместного определения таких пар красителей более целесообразно использовать другие методы идентификации.

3. Метод ВЭЖХ. Возможны такие смеси красителей, в которых, несмотря на явное отличие максимумов спектров поглощения, а также хорошее разделение этой смеси красителей методом ТСХ, из-за разности концентраций красителей, идентифицировать оба красителя в смеси как методом УФ-спектрофотометрии, так и методом ТСХ не удастся. Для эксперимента нами была выбрана пара желтый хинолиновый E104 — желтый «Солнечный закат» E110 (такое сочетание красителей в данном соотношении концентраций нередко встречается для оболочек капсул). Максимумы спектров поглощения этих красителей отстоят друг от друга на 40 нм, R_f красителей — 0,8 и 0,65 соответственно. В модельной смеси концентрация красителя желтый «Солнечный закат» E110 существенно меньше, чем концентрация красителя желтый хинолиновый E104 (1:50). Разделение этих красителей методом ТСХ и УФ-спектрофотометрии невозможно — вышеизложенным методам не хватает селективности и чувствительности. На Рис. 11 и Рис. 12 приведены хроматограммы раствора смеси выбранной пары пищевых красителей методом ВЭЖХ. Подвижная фаза представляет собой смесь объемов раствора тетрабутиламония гидроксида в воде с pH 3.0 и метанола; неподвижная фаза — силикагель октадецилсилильный. Условия детектирования были выбраны на основании данных, полученных методом УФ-спектрофотометрии (420 нм для красителя желтый хинолиновый E104 и 483 нм для красителя желтый «Солнечный закат» E110).

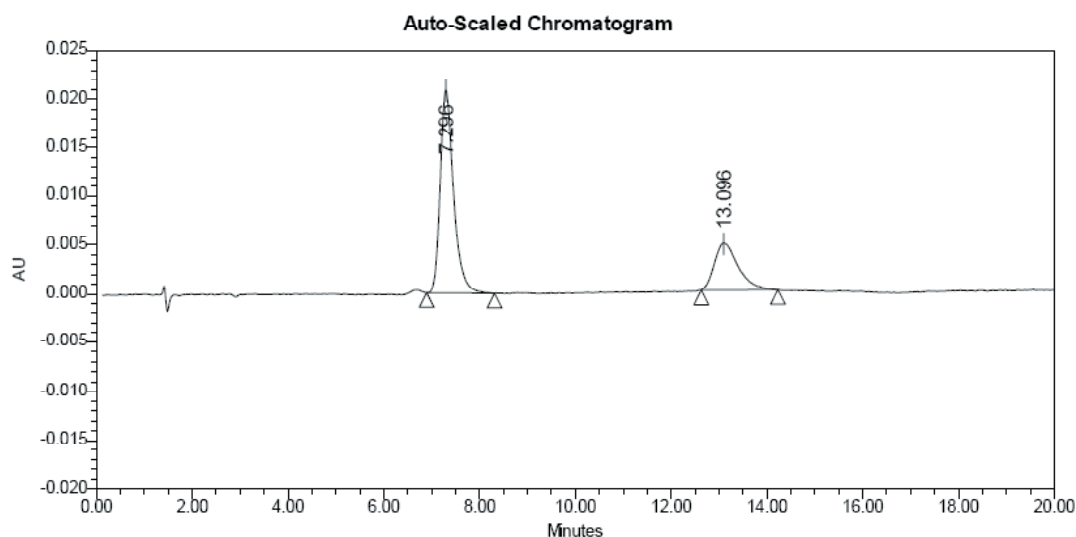
Краситель E104 на хроматограмме ВЭЖХ имеет две зоны, поскольку в состав красителя

входят 2 вещества с различной степенью сульфатирования (Табл. 1).

На основании приведенных выше данных можно сказать, что для выбранной пары красителей, не идентифицируемой другими методами, методика обладает достаточной селективностью. Ввиду использования сложного и дорогого оборудования, большего, по сравнению с ТСХ, расхода растворителей и больших требований к их чистоте, а также большего времени анализа данный метод целесообразно применять только в случае, если идентифицировать красители другими методами не представляется возможным.

4. Идентификация по селективным реакциям неорганических красителей. Для неорганических красителей, в состав которых входят, например, железо, титан, целесообразно их идентифицировать по присутствию этих элементов. Селективность таких реакций и предельные концентрации обнаруживаемых элементов/ионов многократно описаны в литературе, например, идентификация титана диоксида с помощью водорода пероксида [13, 14]. Нами была апробирована эта методика идентификации титана диоксида, основанная на обработке титана диоксида серной кислотой и последующей реакцией с водорода пероксидом с образованием

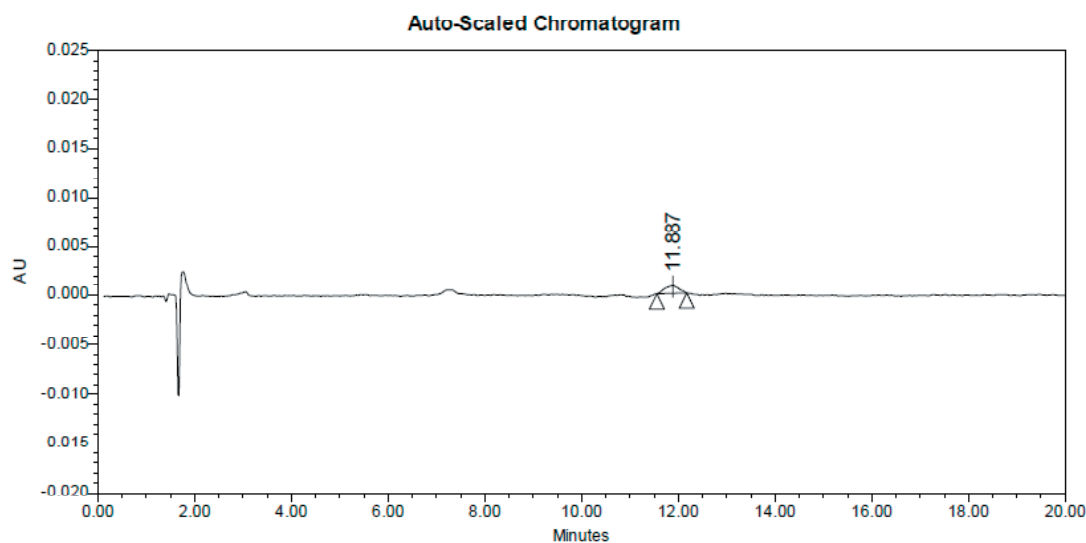
Рисунок 11



Хроматограмма смеси красителей E 104 и E110 (1:50) при длине волны 420 нм

На хроматограмме видны только пики красителя E104.

Рисунок 12



Хроматограмма смеси красителей E 104 и E110 (1:50) при длине волны 483 нм

На хроматограмме виден пик красителя E110 и пик красителя E 104 (около 7.3 мин).

желтовато-оранжевого окрашивания. Полученные результаты подтвердили корректность ее использования для анализа лекарственных средств и их оболочек. Также нами были апробированы методики идентификации железа(II) оксида и железа(III) оксида, основанные на образовании окрашенных комплексных соединений, при взаимодействии соответствующих ионов железа с ферроцианидом и феррицианидом. Полученные результаты подтвердили корректность и селективность этих методик, что позволяет использовать их для анализа лекарственных средств и их оболочек.

5. Идентификация по неспецифическим компонентам органического красителя. Краситель карамель - натуральный краситель, который представляет собой сложную коллоидную смесь соединений, получаемую термической обработкой углеводов. Ввиду сложного и варьирующего состава данного красителя прямое определение его является невозможным. Данный краситель определяют косвенными методами: определение 5-гидроксиметил-2-фуральдегида методом ВЭЖХ (это соединение является продуктом деградации гексоз), реакцией Майяра (нагревание с азотсодержащими соединениями с образованием окрашенных веществ меланоидной структуры), а также методом связывания красителя с различными сорбентами (фосфорилцеллюлоза, ДЕАЕ-целлюлоза), где вычисляется разница между поглощением растворов до взаимодействия с сорбентом и после [15]. Для эксперимента нами был выбран краситель E150d — карамель, полученная по аммиачно-сульфатной технологии. Ввиду того, что иногда таким красителем подкрашивают лекарственные средства, содержащие сахар, методы, основанные на определении 5-гидроксиметилфурфуrolа, а

также реакцию Майяра, в таких случаях, ввиду их положительного отклика на сахара, использовать нецелесообразно — отсутствует необходимая селективность. В таком случае необходимо использовать метод определения разницы между поглощениями испытуемого раствора до и после связывания красителя с различными сорбентами.

Нами была апробирована методика идентификации красителя E150d, основанная на определении разницы между поглощениями испытуемого раствора до и после связывания красителя с фосфорилцеллюлозой и ДЕАЕ-целлюлозой. Полученные результаты подтвердили корректность ее использования для анализа лекарственных средств и их оболочек.

На основании всего вышеизложенного, предложена следующая схема выбора метода анализа пищевых красителей в ЛС/оболочках ЛС (Рис. 13).

Выводы

Для тринадцати наиболее часто применяемых в фармацевтической промышленности пищевых красителей различных типов (неорганические, органические индивидуальные вещества, органические красители с неспецифическим компонентным составом) изучена возможность их идентификации методами УФ-спектрофотометрии, ТСХ, ВЭЖХ и специфическими качественными реакциями.

Показана перспективность дифференциального подхода к выбору метода в зависимости от качественного и количественного состава смеси красителей при разработке методик контроля качества.

Предложен алгоритм выбора метода анализа для пищевых красителей различных типов.

Рисунок 13

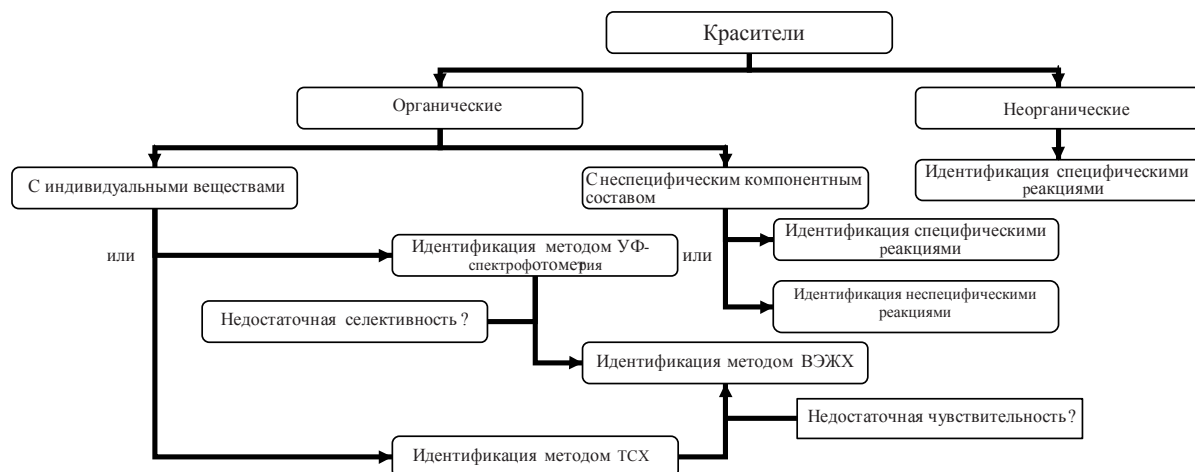


Схема выбора метода анализа пищевых красителей в ЛС/оболочках ЛС

Резюме

Котов А.Г., Леонтьев Д.А., Леонтьев Д.Д., Гризодуб О.І.

Розробка методології вибору методу аналізу для ідентифікації харчових барвників

Вивчено можливість ідентифікації деяких харчових барвників методами УФ-спектрофотометрії, ТЛХ, ВЕРХ і специфічними якісними реакціями. Показано перспективність диференціального підходу до вибору методу, залежно від якісного та кількісного складу суміші барвників при розробці методик контролю якості. Запропоновано алгоритм вибору методів аналізу для ідентифікації барвників різної природи.

Summary

Kotov A.G., Leontiev D.A., Leontiev D.D., Gryzodub A.I.

Development of the methodology for the selecting the method of analysis for the identification of food dyes

The possibility of the identifying of certain food dyes by UV-spectrophotometry, TLC, HPLC and by specific qualitative reactions was examined. The prospects of a differential approach to methods' selection of based on qualitative and quantitative composition of the mixture of dyes at the development of quality control methods was shown. An algorithm for selecting of analytical methods for the identification of dyes of different nature was proposed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пищевые красители. — Режим доступа: http://ru.wikipedia.org/wiki/Пищевые_красители. - Заголовок з екрану.
2. Наказ МОЗ України від 15.01.2003 року «Про затвердження переліків допоміжних речовин та барвників, дозволених до застосування у виробництві лікарських засобів, що (лікарські засоби) реєструються в Україні та виготовляються в аптечних умовах за рецептами лікарів і замовленнями лікувально-профілактичними засобами. — Режим доступа: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0069-03>. - Заголовок з екрану.
3. Директива 2003/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 25 июня 2003 года. — Режим доступа: http://www.pharma-center.kiev.ua/site/file_uploads//ua/es_doc/d_2003_63.doc.
4. Приказ № 426 «Об утверждении Порядка проведения экспертизы материалов на лекарственные средства, которые подаются на государственную регистрацию (перерегистрацию), а также экспертизы материалов о внесении изменений в регистрационные материалы на протяжении действия регистрационного свидетельства (с изменениями, внесенными согласно Приказа Министерства здравоохранения Украины №95 от 01.03.2006)». - Режим доступа: http://www.pharma-center.kiev.ua/site/file_uploads//ua/new_doc/n_426.doc.
5. Пат. 2177150 Российская Федерация, G 01 N 30/94. Способ разделения и идентификации пищевых синтетических красителей: Пат. 2177150 Российская Федерация, G 01 N 30/94 И.И. Малахова; В.Д. Красиков; А.П. Пацовский; Д.Х. Кулев; Закрытое акционерное общество «Научно-технический центр «Ленхром»; Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых ароматизаторов, кислот и красителей. - Заявл. 07.12.1999; Опубл. 20.12.2001.
6. Смирнов Ю.Н. Определение синтетических красителей в напитках методом быстрой высокоэффективной жидкостной хроматографии [Электронный ресурс] / Ю.Н. Смирнов. — Режим доступа <http://www.epac-service.ru/main.php?id=707>. - Заголовок з екрану.
7. ГОСТ Р 52470-2005. Национальный стандарт РФ. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в алкогольной

продукции. — Введен впервые; Введ. 29.12.05. — Стандартинформ, 2006. — 22 с.

8. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 июня 2003 г.). Дата введения 30 июня 2003 года. — Режим доступа <http://jurbase.ru/posttr/docum296/index.htm>.

9. ВФС 42-1446-84. Кислотный красный 2С для фармацевтических целей. 2,11-азонафталин-1-окси-4,4-дисульфокислоты натриевая соль. — Взамен МРТУ 42-3872-70; Введ. 10.07.84. — Министерство здравоохранения СССР, 1984. — 7 с.

10. ФС 42-2901-92. Церулезум. — Взамен ВФС 42-1304-83; Введ. 30.10.92. - Министерство здравоохранения РФ, 1992. — 3 с.

11. ФС 42-2902-92. Руберозум. — Взамен ВФС 42-1306-83; Введ. 30.10.92. - Министерство здравоохранения РФ, 1992. — 3 с.

12. ФС 42-2906-92. Флаварозум. — Взамен ВФС 42-1305-83; Введ. 30.10.92. - Министерство здравоохранения РФ, 1992. — 3 с.

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

14. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» — 1-е вид. — Доповнення 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — 540 с.

15. Commission Directive 95/45/EC of 26 July 1995 laying down specific purity criteria concerning colours for use in foodstuffs. — Режим доступа http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav13_en.pdf.

Котов Андрей Георгиевич. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ведущий научный сотрудник. ГП УНФЦКЛС. К.фарм.н. (1996). Ст. научн. сотр. (2004). Руководитель научного направления «Лекарственное растительное сырье» отдела ГФУ ГП УНФЦКЛС.

Леонтьев Дмитрий Анатолиевич (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Заместитель директора ГП УНФЦКЛС по научной работе (2005). Руководитель отдела «Валидация и стандартные образцы» отдела ГФУ ГП УНФЦКЛС. К.фарм.н. (1997).

Леонтьев Денис Дмитриевич. Окончил Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт» (2009). Мл. научн. сотр. ГП УНФЦКЛС.

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

Фармакологічні дослідження

УДК 616-005.4: 615.217.34:547.756

Цубанова Н.А., Штриголь С.Ю., Ходаківський О.А..

Національний фармацевтичний університет

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на кровопостачання головного мозку, деструкцію нейронів і кислотно-лужний баланс при експериментальній церебральній ішемії

Встановлено, що спіроциклічне похідне оксіндолу у дозі 5 мг/кг не впливає на базальний кровобіг у внутрішній сонній артерії щурів, але покращує кровопостачання головного мозку із даного басейну при білатеральній каротидній оклюзії з наступною реперфузією. Інтегральна захисна дія досліджуваної сполуки при експериментальній церебральній ішемії характеризується зменшенням нейронспецифічної енолази у крові у 2.3 рази та нормалізацією кислотно-лужної рівноваги. Встановлено, що нова сполука має потужну церебропротекторну активність на рівні вінпоцетину й антигіпоксичний ефект на рівні мексидолу.

Гостра цереброваскулярна патологія є другою причиною летальних кінців після інфаркту міокарда [11]. Щороку на церебральні інсульти хворіють 100 тис. українців [1]. Патогенез ушкодження церебральних структур за судинних ішемічних уражень звичайно є типовим. Синдром ішемії завжди визначає тяжкість функціонально-морфологічного ураження мозку [10, 12]. Головним патобіохімічним компонентом синдрому клітинної, тканинної й органної ішемії є енергодефіцит [4]. Раціональна фармакокорекція церебральних патологій має включати препарати з антигіпоксантами, мембранопротекторною дією та здатністю зменшувати енергодефіцит [3].

Перспективним у цьому аспекті можна вважати нову сполуку - 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол] (далі сполука 77), що синтезована у НФаУ к.ф.н. Редькіним Р.Г., проф. Шемчуком Л.А. та у попередніх дослідженнях виявила значну антигіпоксантами активність [5] і церебропротекторну дію за критеріями виживаності та зменшення неврологічного дефіциту у щурів з гострою церебральною ішемією [6].

Метою даної роботи є вивчення впливу спіроциклічного похідного оксіндолу на кровопостачання головного мозку, деструкцію нейронів і кислотно-лужний баланс при експериментальній церебральній ішемії.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою (180-250) г. Сполуку 77 у дозі 5 мг/кг, що виявляє найбільший антигіпоксантами ефект [5], вводили щодня у шлунок протягом 3 діб, востаннє за (30-40) хв до моделювання порушення мозкового крово-

обігу за ішемічним типом у передньомозковому басейні, що відтворювали під наркозом (ке-тамін, 50 мг/кг внутрішньоочеревинно) шляхом білатеральної каротидної оклюзії [2, 7].

У першій серії дослідів визначали динаміку кровопостачання головного мозку при ішемії з подальшою реперфузією. Для цього препарували судини, підводили провізорні лігатури, накладали датчик ультразвукового флоуметра Т-106 (Transonic Systems Inc., США) на ліву внутрішню сонну артерію. Після стабілізації гемодинаміки вимірювали базальний кровобіг, перев'язували праву загальну сонну артерію та накладали мініатюрний затискач на ліву загальну сонну артерію на 40 хв, що повністю припиняло кровопостачання головного мозку з каротидного басейну. Через 40 хв знімали затискач і визначали кровобіг у лівій внутрішній сонній артерії у динаміці реперфузії протягом 60 хв. Як референс-препарат використовували відомий церебропротектор вінпоцетин (ЗАТ «ФФ«Дарниця»», Україна) у дозі 5 мг/кг в режимі, аналогічному введенню сполуки 77 [7].

У другій серії дослідів у щурів із необоротною білатеральною каротидною оклюзією, яким вводили сполуку 77 за вищенаведеною схемою, через 1 добу вимірювали вміст нейронспецифічної енолази (NSE) у крові методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору NSE EIA KIT (DAI, США) на прикладі фірми «Hipson» (Чехія). NSE (2-фосфо-D-гліцератогідролаза, EC 4.2.1.11) гліколітичний нейронспецифічний ензим енолази є маркером ступеня пошкодження нервової тканини [8, 9]. Також визначали показники кислотно-лужного балансу на аналізаторі «Radiometer» (Данія). Для цього у щурів відбирали кров ((0.2-0.3) мл) із сигмоподібного синусу у гепаринізований шприц

і зберігали до проведення аналізу при температурі (3-4) °С протягом не більше 15 хв.

Препаратом порівняння обрано мексидол (100 мг/кг) (ТОВ «НВК «Фармасофт», Росія) – лікарський засіб із вираженою антигіпоксичною та метаболічною дією, що вводили парентерально протягом 3 діб, востаннє за 40 хв до проведення досліду.

Тварини утримувались у стандартних умовах віварію відповідно до правил GLP. При роботі виконували вимоги Директиви Ради ЄС із питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 6.0. із використанням критерія *t* Стьюдента та парного критерію *T* Вілкоксана.

Результати досліджень та їх обговорення

Сполука 77 і препарат порівняння вінпоцетин не змінюють базальний кровообіг у внутрішній сонній артерії (Табл. 1), але результати проведеного раніше дослідження [6] свідчать, що їх застосування збільшує показник виживаності, що відповідає покращенню кровопостачання мозку.

У групі контрольної патології після відтворення 40-хвилинної гострої церебральної ішемії кровообіг становив лише (46-48) % від вихідного рівня і навіть через 60 хв реперфузії даний показник не перевищував 46.7 %, що свідчить про тяжкість патології.

Введення у лікувально-профілактичному режимі сполуки 77 та вінпоцетину вірогідно відновлює мозковий кровообіг вже від перших 5 хв реперфузії (80.5 % та 90.3% відповідно), показники кровообігу залишаються на такому же рівні навіть через 60 хв (81.8 % та 89.4%, відповідно).

Вінпоцетин дещо активніше за сполуку 77 відновлював мозковий кровообіг, проте різниця міжгрупових показників не мала статистично значущих відмінностей (Табл. 1).

Через одну добу після гострої церебральної ішемії у щурів відбувається значна деструкція нейронів головного мозку, індикатором якої є вміст NSE. У тварин групи контрольної патології рівень NSE зростає у 18.2 рази відносно інтактного контролю (Табл. 2).

Введення сполуки 77 зменшує руйнування нейронів головного мозку у 2.3 рази, що виявляється у зменшенні вмісту NSE до 4.43 нг/л.

Найбільш виражений церебропротекторний вплив зафіксовано для мексидолу, рівень NSE становив 2,13 нг/л.

Важливою характеристикою розвитку цереброваскулярної патології є метаболічний зсув кислотно-лужного стану крові. Результати дослідження показників кислотно-лужної рівноваги через 1 добу після гострої церебральної ішемії наведено в Табл. 3.

Модельна церебральна ішемія спричиняє декомпенсований метаболічний ацидоз. На першу добу після відтворення білатеральної

Таблиця 1

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на кровообіг у внутрішній сонній артерії за умов ішемії-реперфузії головного мозку у щурів

Час спостереження	Контрольна патологія, (n=6)		Сполука 77, 5 мг/кг, (n=7)		Вінпоцетин, 5 мг/кг, (n=6)	
	мл/хв	відносно базального, %	мл/хв	відносно базального, %	мл/хв	відносно базального, %
<i>вихідний стан</i>						
0 хв	6.87±0.27	—	6.26±0.12	—	6.50±0.27	—
5 хв	6.85±0.26	—	6.33±0.12	—	6.48±0.21	—
10 хв	6.91±0.27	базальний (100 %)	6.23±0.09	базальний (100 %)	6.40±0.25	базальний (100 %)
<i>ішемія 40 хв із подальшою реперфузією</i>						
5 хв	3.38±0.12**	48.9±0.84	5.03±0.22*#	80.5±2.54	5.85±0.31#	90.3±2.39
10 хв	3.25±0.09**	47.1±0.78	5.06±0.17**#	81.1±1.78	5.77±0.31#	89.9±1.68
20 хв	3.22±0.13**	46.6±1.43	5.00±0.15**#	79.7±1.87	5.77±0.26#	90.0±1.09
30 хв	3.18±0.07**	46.2±1.29	5.01±0.16**#	79.9±1.97	5.80±0.24#	90.6±1.19
40 хв	3.18±0.07**	46.2±1.41	5.06±0.18*#	81.1±1.86	5.80±0.26#	90.6±1.54
60 хв	3.23±0.11**	46.8±0.58	5.10±0.16**#	81.8±1.58	5.73±0.30#	89.4±1.73

Примітки:

відмінності достовірні:

— по відношенню до вихідних показників усереднені групи: * – p<0.01; ** – p<0.001;

— по відношенню до показників контрольної патології # — p<0.05.

каротидної оклюзії у тварин групи контрольної патології зафіксовано достовірні зміни усіх досліджуваних показників кислотно-лужного балансу у венозній крові, що відтікає від головного мозку: в 1.1 рази зменшується рН, в 1.2 рази зростає парціальний тиск CO₂. Значний зсув рівноваги у бік ацидозу підтверджується вірогідним зниженням вмісту основ у крові: істинного бікарбонату та стандартного бікарбонату - в 1.9 рази; суми основ усіх буферних систем - у 2 рази; значним дефіцитом буферних основ ((-3.12±0.23) ммоль/л), також відзначається значне зниження рівня гемоглобіну, що складає одну з буферних систем крові, та парціального тиску кисню (табл.3).

Сполука 77 нормалізує всі показники кислотно-лужної рівноваги на рівні мексидолу або дещо краще. Компенсація метаболічного ацидозу, фізіологічний рівень гемоглобіну та парціального тиску кисню на 1 добу після глобальної церебральної ішемії свідчать про потужний антигіпоксантичний і церебропротекторний вплив сполуки 77.

Таким чином, встановлена церебропротекторна активність сполуки 77 на моделі гострої церебральної ішемії складається із потужної антигіпоксичної дії та інтенсифікації кровопостачання головного мозку. Інтегральний церебропротекторний вплив сполуки 77 на ішемізований мозок характеризується вірогідним зменшенням деструкції нейронів, про що свідчить зниження у 2.3 рази специфічного ензиму NSE у крові та значна нормалізація церебрального метаболізму.

Висновки

Сполука 77 у дозі 5 мг/кг не впливає на базальний кровобіг у внутрішній сонній артерії щурів, але за умов ішемії-реперфузії у каротидному басейні вірогідно нормалізує цей показник до 81.8 % від базального рівня, практично не поступаючись при цьому активності препарату порівняння вінпоцетину. Механізм церебропротекторної дії 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу], ймовірно, обумовлено

Таблиця 2

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на вміст нейронспецифічної енолази у крові через одну добу після гострої церебральної ішемії у щурів

Група	Нейронспецифічна енолаза		p
	нг/л	%	
інтактний контроль, (n=8)	0.55±0.50	100	—
контрольна патологія, (n=7)	10.0±0.47	1818	p ₂₋₁ <0.001
сполука 77, 5 мг/кг, (n=7)	4.43±0.09	805	P ₃₋₁ <0.001 P ₃₋₂ <0.001
мексидол, 100 мг/кг, (n=7)	2.13±0.19	387	P ₄₋₁ <0.05 P ₄₋₂ <0.001 P ₄₋₃ <0.001

Таблиця 3

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на показники кислотно-лужної рівноваги у венозній крові через одну добу після гострої церебральної ішемії у щурів

Показник	Інтактний контроль, (n=8)	Контрольна патологія, (n=7)	Сполука 77, 5 мг/кг, (n=7)	Мексидол, 100 мг/кг, (n=7)
pH	7.22±0.001	6.83±0.02***	7.15±0.009***###	7.14±0.009***###
парціальний тиск CO ₂ , мм.рт.ст.	74.9±1.07	89.7±1.29***	73.3±1.31###	74.2±1.86###
парціальний тиск O ₂ , мм.рт.ст	76.6±0.81	57.8±1.20***	71.0±1.34###	67.0±3.42**
гемоглобін, г/дл	11.1±0.36	8.77±0.44**	11.8±0.36##	10.9±0.31##
істинний бікарбонат, ммоль/л	24.0±0.63	12.7±0.39***	20.4±0.98*	21.0±0.59*
стандартний бікарбонат, ммоль/л	25.4±0.63	13.0±0.31***	21.4±0.66***###	20.5±0.58***###
сума основ усіх буферних систем, ммоль/л	24.9±1.51	12.5±0.29***	19.5±0.82***###	17.9±0.53***###
дефіцит буферних основ, ммоль/л	1.82±1.12	-3.12±0.23***	0.98±0.29###	0.50±0.15###

Примітки:

відмінності достовірні:

— по відношенню до показників групи інтактного контролю: * — p<0.05; ** — p<0.01; *** — p<0.001;

— по відношенню до показників контрольної патології: # — p<0.05; ## — p<0.01; ### — p<0.001

впливом досліджуваної сполуки на різні ланки патогенезу церебральної ішемії. Нова сполука виявляє антигіпоксантичну дію, відновлює кровообіг, знижує руйнування нейронів головного мозку (за вмістом нейронспецифічної енолази) та зменшує метаболічний ацидоз на рівні препарату порівняння мексидолу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Поліщук М.С. Разом долаючи проблему мозкового інсульту в Україні / М.С. Поліщук // Здоров'я України. - 2010. - № 4 (15). - С. 8-9.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИА «Ремедиум». - 2000. — 398 с.
3. Федин А.И. Интенсивная терапия ишемического инсульта / А.И. Федин А.И., С.А. Румянцева. — М.: Медицинская книга, 2004. - 289 с.
4. Церебральная ишемия и ее коррекция антиоксидантами // В.Н. Евсеев, С.А. Румянцева, Е.В. Силина, О.П. Сохова, С.П. Свищева // РМЖ. - 2011. - № 5. — С. 18-23.
5. Цубанова Н.А. Скринінгові дослідження антигіпоксичної дії спіроциклічних 2-оксіндолічних похідних 2-аміно-3-ціаногідрату / Н.А. Цубанова // Клінічна фармація. - 2009. - Т. 13, № 2. - С. 62-64.
6. Цубанова Н.А. Дослідження церебропротекторної дії та гострої токсичності нової сполуки, спіроциклічного похідного оксіндолу / Н.А. Цубанова, С.Ю. Штриголь // Український біофармацевтичний журнал. - 2010. - № 1(6). - С. 36-41.
7. Штриголь С.Ю. Модуляція фармакологічних ефектів при різних солевих режимах / С.Ю. Штриголь. — Х.: Авіста-ВЛТ, 2007. — 360 с.
8. Anand N. Neuron-specific enolase as marker for acute ischemic stroke: a systematic review / Nishant Anand, Latha G. Stead // Cerebrovasc. Dis. — 2005. — Vol. 20, № 4. — P. 213-219.
9. Chekhonin V.P. Serum time course of two brain-specific proteins, alpha(1) brain globulin and neuron-specific enolase, in tick-born encephalitis and Lyme disease / V.P. Chekhonin, Y.A. Zhirkov, I.A. Belyaeva // Clin. Chim. Acta. - 2002. - Vol. 320, № 1-2. — P. 117—125.
10. Kaori Miwa. Silent Cerebral Infarction is Associated with Incident Stroke and TIA Independent of Carotid Intima-Media Thickness / Kaori Miwa, Taku Hoshi, Hidetaka Hougaku et al. // J. Internal Medicine. — 2010. - Vol. 49, № 9. — P. 817-822
11. Goldstein L.B. Is this patient having a stroke? / L.B. Goldstein, D.L. Simel // J. American Med. Association. - 2005. - Vol. 293, № 19. — P. 2391—2402.
12. Ringleb P.A. Safety of endovascular treatment of carotid artery stenosis compared with surgical treatment: a meta-analysis / P.A. Ringleb, G. Chatellier, W. Hacke et al. // J. Vasc. Surg. - 2008. - Vol. 47, № 2. - P. 350—355.

Резюме

Цубанова Н.А, Штриголь С.Ю., Ходаковский А.А.

Влияние спироциклического производного оксіндола на кровоснабжение головного мозга, деструкцию нейронов и кислотно-щелочной баланс при экспериментальной церебральной ишемии

Установлено, что спироциклическое производное оксіндола в дозе 5 мг/кг не влияет на базальный кровоток во внутренней сонной артерии крыс, но улучшает кровоснабжение головного мозга из данного бассейна при билатеральной каротидной окклюзии с последующей реперфузией. Интегральное защитное действие изучаемого соединения при экспериментальной церебральной ишемии характеризуется уменьшением нейронспецифической енолазы в крови в 2.3 раза и нормализацией кислотно-щелочного равновесия. Установлено, что новое соединение имеет выраженную церебропротекторную активность на уровне винпоцетина и антигипоксический эффект на уровне мексидола.

Summary

Tsubanova N.A, Shtrygol S.Yu., Khodakovskiy O.A.

Impact of oxindole spirocyclic derivative to brain blood supply, destruction of neurons and acid-base balance at experimental cerebral ischemia

It was established that oxindole spirocyclic derivative at the dose of 5 mg /kg did not effect to basal blood circulation in internal carotid arteries of rats, but improved the blood supply to the brain from this basin during bilateral carotid occlusion followed by reperfusion. Integral protection effect of examined substance at experimental cerebral ischemia was characterized by a decrease of blood neuron-specific enolase (NSE) in 2.3 times and normalization of acid-alkaline balance. It was established that the new substance had a strong cerebroprotection effect at the level of vinpocetine and anti-hypoxic effect compared with the efficacy of mexidolum.

Цубанова Наталя Анатолівна. К.фарм.н. Доцент кафедри технології ліків та клінічної фармакології із фармацевтичною опікою Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Штриголь Сергій Юрійович. Д.м.н. Зав. кафедри фармакології НФаУ.

Ходаківський Олексій Анатолійович. К. м.н.. Асистент кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Організація діяльності фармацевтичних підприємств

УДК 615.12:658.310

Мнушко З.М., Пестун І.В., Бондарева І.В.
Національний фармацевтичний університет

Сучасні підходи до процесу управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах

Представлено результати дослідження процесу управління змінами на фармацевтичних підприємствах. Проаналізовано за значущістю основні зміни, що відбулися в роботі виробничих фармацевтичних підприємств за останні 10 років. Встановлено причини опору змінам із боку підлеглих і поширені способи їх подолання. Визначено основні адаптивні заходи, що проводяться виробничими фармацевтичними організаціями для пристосування до змін у зовнішньому макросередовищі.

Останнім часом для українських фармацевтичних підприємств актуальною є проблема адаптації до змін зовнішнього середовища. Виробничі фармацевтичні підприємства здебільшого не можуть контролювати зміни у макроточенні або впливати на них, тому вони змушені швидко адаптуватися до них у своїй діяльності, проводити реорганізацію або зміни, що є найважливішою умовою їх ефективного функціонування.

У роботах вітчизняних і зарубіжних авторів представлено аналіз моделей управління змінами в організації [3, 7-10]. У наукових фахових виданнях із фармації наявні статті, присвячені питанням впливу складових макросередовища на діяльність фармацевтичних організацій [2, 4-6]. Проте практично не проводились дослідження стосовно процесу управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах.

У літературі відсутня інформація стосовно дослідження процесу управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах, а саме: визначення основних змін, що відбулися у роботі вітчизняних фармацевтичних підприємств, наявності опору змінам із боку персоналу, основних причин опору змінам із боку підлеглих і способів їх подолання.

Метою даної роботи є обґрунтування науково-практичних підходів до процесу управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах.

У ході дослідження було використано методи анкетного опитування, статистичний, графічний, порівняльний.

У більшості організацій замислюються над тим, що необхідно змінити для того, щоб покращити діяльність компанії та підвищити якість її продукції, але при цьому людський чинник, безпосередньо пов'язаний із реалізацією подібних рішень, нерідко залишається без уваги. Для успішного впровадження глобальних

змін компаніям необхідно встановити зв'язок між організацією, працівниками та змінами, що будуть впроваджені. Це завдання досягається шляхом заохочення більш гнучких відносин серед персоналу організації. Зміни викликають складнощі у роботі, пристосовуватися до них нелегко. Але у той же час зміни життєво необхідні, головне — навчитися сприймати їх як із професійної, так і з особистої точки зору.

Управління змінами — структурований процес, завдання якого — запропонувати та впровадити зміни відповідно до технічних і економічних можливостей організації.

Нами було проаналізовано суть основних змін, що відбулися в роботі вітчизняних виробничих фармацевтичних підприємств за останні 10 років. Для цього методом анкетного опитування керівники різного рівня фармацевтичних підприємств оцінили перелік проведених заходів за 10-бальною шкалою (табл. 1).

До основних змін, що відзначені найбільшою кількістю балів, і, відповідно, що є найвагомішими для виробничих фармацевтичних підприємств віднесені такі: розширення асортименту, введення нових посад, зміна організаційної структури та вдосконалення системи заохочення співробітників. Варто звернути увагу, що деякі підприємства не оцінили належним чином вплив таких змін, як створення маркетингових інформаційних систем і програмного забезпечення маркетингового аналізу та створення CRM-системи (системи управління взаємостосунками із клієнтами), що свідчить про необхідність їх стосовно цих показників або про відсутність коштів на впровадження цих змін.

В умовах нестабільності зовнішнього середовища найважливішою умовою ефективного управління для виробничих фармацевтичних підприємств є здатність змінюватись, проте водночас зростає опір змінам із боку персоналу. Під опором слід розуміти зворотну реакцію

на зміни, пов'язані з непередбаченими відтермінуваннями, додатковими витратами, нестабільністю стратегічних змін, спробами саботувати перетворення усередині організації або «втопити» їх у потоці інших завдань [7]. У ході нашої роботи було розглянуто процес управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах: визначено основні причини опору змінам із боку персоналу (Рис. 1) та основні способи їх подолання [1].

Рисунок 1



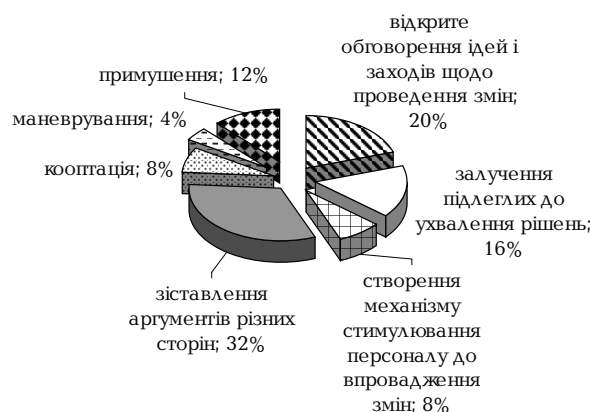
Структура основних причин опору змінам із боку персоналу на виробничих фармацевтичних підприємствах

Встановлено, що 73 % керівників стикаються з опором змінам із боку персоналу, із яких 53 % — постійно, 20 % — інколи. Серед основних причин опору змінам із боку підлеглих респонденти відзначили: страх перед «новим» (26 % респондентів), невизначеність ситуації,

що склалася, та переконання, що зміни не призведуть до покращення ситуації (22 % і 19 % респондентів, відповідно).

Досліджено основні способи подолання опору змінам на виробничих фармацевтичних підприємствах (Рис. 2). До відзначених респондентами належать: зіставлення аргументів різних сторін (використовують 32 % респондентів), відкрите обговорення ідей і заходів щодо проведення змін (20 % респондентів), залучення підлеглих до ухвалення рішень (16 % респондентів).

Рисунок 2



Основні способи подолання опору змінам на виробничих фармацевтичних підприємствах

Управління змінами є складним і важко передбачуваним процесом, що не має універсальної моделі успішного перетворення [7]. Поряд із цим, для ефективного управління змінами на

Таблиця 1

Значущість основних змін, що відбулися за останні 10 років у роботі виробничих фармацевтичних підприємств

Зміна	Бали										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
зміна організаційної структури	33.4	—	—	—	—	6.7	—	13.3	13.3	13.3	20.0
введення нових посад	—	—	—	—	13.3	—	—	13.3	40.1	13.3	20.0
розширення додаткових послуг	6.7	—	—	—	6.7	6.7	40.1	—	13.3	13.3	13.3
зміна форми власності	—	—	—	—	—	26.7	6.7	26.7	26.7	13.3	—
розширення асортименту	—	—	—	6.7	13.3	—	13.3	13.3	13.3	—	40.1
проведення маркетингових досліджень	—	—	6.7	13.3	—	13.3	13.3	26.7	26.7	—	—
поява ділянок, сертифікованих за GMP	—	13.3	—	—	—	26.7	40.1	—	6.7	13.3	—
вдосконалення системи заохочення співробітників	—	—	—	—	13.3	13.3	6.7	33.4	6.7	13.3	13.3
створення маркетингових інформаційних систем і програмного забезпечення маркетингового аналізу	13.3	—	—	—	—	13.3	40.1	26.7	—	6.7	—
створення CRM-системи	13.3	—	6.7	13.3	—	40.1	13.3	6.7	—	6.7	—

виробничих фармацевтичних підприємствах доцільно дотримуватись таких рекомендацій: необхідно аналізувати підприємство та його потребу у перетвореннях; сформувати загальне бачення та напрямок дій; звільнитися від минулого; створити відчуття неминучості змін; знайти та підтримати сильного лідера; розробити план реалізації змін; побудувати структури підтримки; налагодити комунікації, залучати персонал; відслідковувати, вдосконалювати й інституціоналізувати зміни. Отже, для виживання в умовах нестабільності зовнішнього середовища й адаптації до нових реалій виробничим фармацевтичним підприємствам необхідно постійно змінюватись. Цей процес є досить складним для організацій і потребує управління ним.

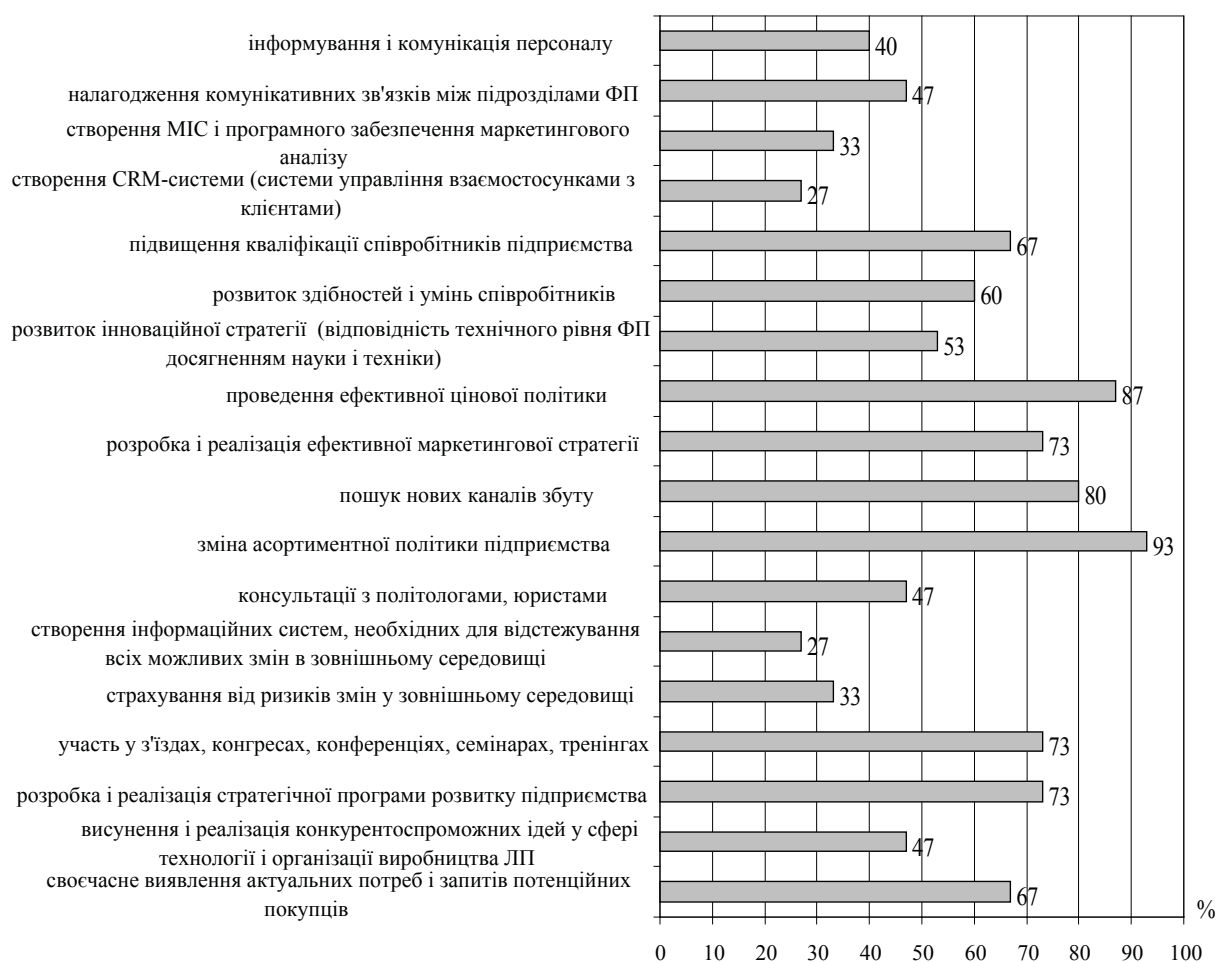
Сьогодні в умовах нестабільного зовнішнього оточення діяльність вітчизняних виробничих фармацевтичних підприємств пов'язана із різким коливанням курсу іноземної валюти, нестабільністю поставок енергетичних ресурсів, низькою платоспроможністю контрагентів,

відсутністю притоку інвестиційних коштів на заміну застарілого обладнання та впровадження нових конкурентоспроможних технологій. Усе це є свідченням необхідності вирішення проблеми підвищення ефективності діяльності підприємств. Тому фармацевтичним підприємствам необхідно вчасно аналізувати та прогнозувати зміни, що відбуваються у зовнішньому середовищі, визначати та реалізовувати заходи, спрямовані на пристосування підприємств до нових реалій.

У ході опитування респонденти відзначили адаптивні заходи, що проводяться виробничими фармацевтичними підприємствами (Рис. 3).

Таким чином, основними адаптивними заходами для фармацевтичних підприємств є такі: зміна асортиментної політики підприємств (використовують 93 % респондентів), здійснення ефективної цінової політики (87 %), пошук нових каналів збуту (80 %), розробка та реалізація ефективної маркетингової стратегії, участь у з'їздах, конгресах, конференціях, семінарах,

Рисунок 3



Основні адаптивні заходи, що проводяться виробничими фармацевтичними підприємствами

тренінгах і розробка та реалізація стратегічної програми розвитку виробничих фармацевтичних підприємств (73 %). Найменш вживаними виявилися такі адаптивні заходи: інформування та комунікація із персоналом (40 % респондентів); страхування від ризиків змін у зовнішньому середовищі та створення маркетингових інформаційних систем і програмного забезпечення маркетингового аналізу (по 33 % респондентів, відповідно); створення інформаційних систем, необхідних для відстежування всіх можливих змін у зовнішньому середовищі та створення CRM-системи (по 27 %, респондентів, відповідно). Останні дані свідчать про недостатній рівень розвитку інформаційних технологій на виробничих фармацевтичних підприємствах.

Таким чином, результати, одержані на даному етапі, дозволяють зробити висновок про те, що дослідження процесу управління змінами є невід'ємною частиною успішної діяльності виробничих фармацевтичних підприємств.

Висновки

Досліджено процес управління змінами на виробничих фармацевтичних підприємствах: виділені основні зміни, що відбулися в роботі вітчизняних фармацевтичних підприємств за останні 10 років.

Встановлено, що 73 % керівників фармацевтичних підприємств стикаються з опором змінам із боку персоналу, із них 53 % - постійно. Визначено причини опору змінам із боку підлеглих та досліджено основні способи їх подолання.

Виділено найбільш поширені управлінські заходи, що проводяться виробничими фармацевтичними організаціями для адаптації до змін у зовнішньому макросередовищі.

ЛІТЕРАТУРА

- Бондарєва І.В. Управління змінами на фармацевтичних підприємствах / І.В. Бондарєва, З.М. Мнушко // Працюємо, творимо, презентуємо: Тези доповідей 78-ої міжвузівської наукової конференції студентів і молодих вчених із міжнар. участю, 2-3 квітня 2009 року. — Івано-Франківськ, 2009. — С. 133.
- Бондарєва І.В. Аналіз вибору фармацевтичними підприємствами заходів для адаптації до змін зовнішнього середовища / І.В. Бондарєва, З.М. Мнушко // Сьогодні та майбутнє медицини: Матеріали VI міжнародної наукової конференції студентів і молодих вчених, 9-10 квітня 2009 року. — Вінниця, 2009. — С. 188-189.
- Дослідження стратегічних пріоритетів управління фармацевтичними організаціями за умови змін середовища функціонування / Громовик Б.П., Борищук В.О., Мокрянин С.М., Кухар О.О. // Фармацевтичний журнал. — 2006. — № 6. — С. 3—8.
- Мнушко З.М. Оцінка впливу факторів макросередовища на роботу аптечних закладів / З.М. Мнушко, І.В. Підліснюк, І.В. Пестун // Вісник фармації. — 2008. — № 2 (54). — С. 34-37.
- Мнушко З.М. Оцінка впливу факторів мікро- та макросередовища на роботу фармацевтичних підприємств / З.М. Мнушко, І.В. Підліснюк // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів і молодих вчених, 17-18 травня 2007 року. — Х.: Вид-во НФаУ, 2007. — С. 286—287.
- Пестун І.В. Кількісна оцінка впливу факторів зовнішнього макросередовища на роботу аптечних підприємств: Методичні рекомендації / І.В. Пестун, І.В. Бондарєва, З.М. Мнушко. — Х.: Вид-во НФаУ, 2009. — 23 с.
- Стовба Т.А. Аналіз моделей управління змінами в організації в контексті економіки знань / Т.А. Стовба // Вісник Хмельницького національного університету. — 2005. — № 6. — С. 214—217.
- Hough J. Scanning actions and environmental dynamism / J. Hough, M. White // Management Decision. — 2004. — Vol. 42, № 6. — P. 781—793.
- Walsh P. Dealing with the uncertainties of environmental change by adding scenario planning to the strategy reformulation equation / P. Walsh // Management Decision. — 2005. — Vol. 43, № 1. — P. 113—122.
- Yunggar M. Environmental scanning for strategic information: content analysis from Malaysia / M. Yunggar // The Journal of American Academy of Business. — 2005. — Vol. 6, № 2. — P. 324—331.

Резюме

Мнушко З.Н., Пестун І.В. Бондарєва І.В.

Современные подходы к процессу управления изменениями на производственных фармацевтических предприятиях

Представлены результаты исследования процесса управления изменениями на фармацевтических предприятиях. Проанализированы по значимости основные изменения, которые произошли в работе производственных фармацевтических предприятий за последние 10 лет. Определены причины сопротивления изменениям со стороны подчиненных и распространенные способы их преодоления. Определены основные адаптивные мероприятия, которые проводятся производственными фармацевтическими организациями для приспособления к изменениям во внешней макросреде.

Summary

Mnushko Z.N., Pestun I.V., Bondareva I.V.

Current approaches to the management of changes in pharmaceutical manufacturers

Data of the study of the management of changes in pharmaceutical manufacturers were given. Main changes, which took place at the work of pharmaceutical manufacturers over the past 10 years, were analyzed in accordance with the significance. The causes of the resistance to changes of staff and common ways to overcome this problem were defined. Main adaptive approaches, which have been conducted at pharmaceutical manufacturers for adaptation to changes in the external macroenvironment, were identified.

Мнушко Зоя Миколаївна. Д.фарм.н. (1990). Професор. Зав. кафедри менеджменту та маркетингу у фармації НФаУ.

Пестун Ірина Володимирівна. Д.фарм.н. (2011). Доцент кафедри менеджменту та маркетингу у фармації НФаУ.

Бондарєва Ірина Василівна. Асистент кафедри менеджменту та маркетингу у фармації НФаУ.

Аналітичний огляд

УДК 615.322:616-092.4:611.81

Данилов С.А., Товчига О.В., Степанова С.І., Штриголь С.Ю.
Національний фармацевтичний університет

Лікарські рослини, що мають седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності, їх біологічно активні речовини та механізми їхньої дії

Наведено аналітичний огляд щодо лікарських рослин світової флори із верифікованими в умовах експерименту та/або у клінічних умовах седативними та суміжними психотропними властивостями (перш за все, анксиолітичними, снодійними). Узагальнено відомості про біологічно активні речовини (БАР) цих рослин та механізми їхньої дії на різних рівнях. Висвітлено значущість синергізму БАР для виявлення вищезазначених фармакологічних властивостей фітопрепаратів, а також важливість біофармацевтичних чинників у фітофармакології.

Порушення діяльності ЦНС, пов'язані з підвищеною тривожністю та/або надмірною збудливістю, значно поширені, часто мають хронічний перебіг та погіршують якість життя [1, 2]. Вони часто потребують фармакотерапії, для якої застосовують переважно седативні засоби й анксиолітики. Фармакоепідеміологічні дані свідчать, що седативні й анксиолітичні препарати є одними з найуживаніших у світі [2–4]. Але асортимент таких засобів досить обмежений. Серед анксиолітиків найбільшу доказову базу щодо ефективності та безпечності мають бензодіазепіни, але вони все ж можуть спричинити залежність, синдром відміни та пригнічення ЦНС [5, 6]. Тому триває пошук ефективних і безпечних седативних та анксиолітичних засобів. Все більшу увагу привертають лікарські препарати на основі лікарських рослин (ЛР) [7, 8, 18, 23, 36, 39].

Сучасна офіційна медицина використовує відносно невелику кількість видів ЛР серед багатьох можливих. Дійсно, численні ЛР традиційно наділяють седативними та/або анксиолітичними властивостями. Ефективність і безпечність деяких із них встановлено з достатнім рівнем доказовості, хоча часто інформація обмежена та фрагментарна.

Метою даної роботи є узагальнення даних щодо лікарських рослин, седативний та/або анксиолітичний ефект яких доведено експериментально та/або у клінічних умовах, а також даних щодо біологічно активних речовин (БАР), що спричиняють ці ефекти, та механізмів їх дії.

Лікарські рослини, що мають седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності

Результати пошуку інформації в монографіях, довідниках і оригінальних статтях із ви-

користанням ресурсів Інтернету станом на травень 2011 року дозволяють стверджувати, що седативний та/або анксиолітичний ефект підтверджено у 301 виду рослин, що належить до 91 родини. За кількістю видів лідерами є родини глухокропикові (38 видів), айстрові (22), бобові (19) та селерові (16). У деяких родинях досліджено лише один вид. Часто це пов'язано із цілеспрямованим вивченням флори певного регіону за етноботанічним принципом.

Нижче наводиться перелік родин і видів рослин, а також перелік родин і видів грибів, седативні та суміжні психотропні властивості яких (перш за все анксиолітичні, снодійні) підтверджено у клініці та/або в експерименті. Гриби в таксономічному сенсі не є рослинами, але у фітотерапії традиційно розглядаються разом із ЛР. У дужках наведено кількість видів кожної родини.

Vegetabilia, Plantae — Царство Рослини

Acanthaceae (2): *Acanthus montanus* (Nees) T. Anderson, *Justicia hyssopifolia* L. [7, 8].

Agavaceae (1): *Sansevieria liberica* Gerome et Labroy [9].

Amaryllidaceae (1): *Crinum giganteum* Andrews [7].

Anacardiaceae (2): *Pistacia vera* L., *Spondias mombin* L. [10, 11].

Annonaceae (3): *Annona cherimola* Mill., *A. muricata* L., *Rollinia deliciosa* Saff. [7, 12, 13].

Apiaceae (16): *Aethusa cynapium* L., *Ammi visnaga* (L.) Lam., *Anethum graveolens* L., *Angelica archangelica* L., *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth., *A. sinensis* (Oliv.) Diels, *Apium graveolens* L., *Bupleurum falcatum* L., *Centella asiatica* (L.) Urban, *Conium maculatum* L., *Coriandrum sativum* L., *Ferula sumbul* (Kauffm.) Hook., *Levisticum officinale* Koch, *Pastinaca sativa* L., *Pimpinella affinis* Ledeb., *P. major* (L.) Huds. [7, 10, 14–20].

Apocynaceae (6): *Apocynum venetum* L., *Baphia nitida* Afzel., *Rhazya stricta* Decne, *Vinca minor* L., *V. sardoa* (Stearn) Pignatti, *Voacanga africana* Stapf. [7, 8, 14, 18, 21 – 24].

Araceae (2): *Acorus calamus* L., *A. gramineus* Soland. [18, 20, 25 – 27].

Araliaceae (4): *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim, *Panax ginseng* C.A. Mey, *P. quinquefolius* L., *Symplocarpus renifolius* Schott ex Tzvel. [7, 10, 28 – 33].

Asteraceae (22): *Achillea millefolium* L., *Anacyclus pyrethrum* (L.) Link, *Anthemis arvensis* L., *Arnica montana* L., *Artemisia vulgaris* L., *Calendula officinalis* L., *Carlina vulgaris* L., *Cichorium intybus* L., *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Echinacea purpurea* (L.) Moench., *Filago arvensis* L., *Gnaphalium uliginosum* L., *Lactuca sativa* L., *L. serriola* L., *L. virosa* L., *Matricaria matricarioides* (Less.) Porter, *Microglossa pyrifolia* (Lam.) O. Kuntze., *Prenanthes alba* L., *P. serpentaria* Pursh, *Solidago odora* Ait. *Sphaeranthus indicus* L., *Xanthium strumarium* L. [7, 8, 10, 14, 15, 17, 18, 20, 24, 26, 28, 34 – 40].

Bignoniaceae (1): *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann. ex Bureau [41].

Boraginaceae (3): *Borago officinalis* L., *Echium amoenum* Fisch. et C.A. Mey, *Lithospermum officinale* L. [7, 10, 42].

Brassicaceae (2): *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck, *Lepidium sativum* L. [14, 15].

Cactaceae (1): *Opuntia ficus-indica* Mill. [32].

Caesalpiniaceae (1): *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming [54].

Cannabaceae (2): *Cannabis sativa* L., *Humulus lupulus* L. [10, 15, 26, 37, 71].

Capparaceae (2): *Capparis decidua* (Forssk.) Edgew., *C. herbacea* Willd. [20, 43].

Caprifoliaceae (1): *Viburnum opulus* L. [26].

Caryophyllaceae (2): *Drymaria cordata* L. Willd., *Melandrium album* (Mill.) Garcke [15, 44].

Chenopodiaceae (1): *Chenopodium album* L. [14].

Clusiaceae (4): *Hypericum hircinum* L., *H. perforatum* L., *H. perforatum* L., *Kielmeyera coriacea* Mart. ex Saddi [7, 40, 59 – 62].

Convallariaceae (3): *Convallaria majalis* L., *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce var. *pluriflorum* (Miq.) Ohwi [10, 15, 32].

Convolvulaceae (1): *Ipomoea stans* Cav. [18].

Crassulaceae (2): *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., *Rhodiola rosea* L. [28, 45].

Cucurbitaceae (1): *Momordica involucreta* E. Mey. ex Sond [46].

Cupressaceae (1): *Biota orientalis* (L.) Endl. [10, 20].

Cyperaceae (2): *Cyperus articulatus* L., *C. rotundus* L. [47, 48].

Dilleniaceae (1): *Davilla rugosa* Poir. [7, 40].

Droceraceae (1): *Drosera rotundifolia* L. [15].

Ebenaceae (1): *Diospyros mespiliformis* Hochst. ex A. DC. [49].

Empetraceae (1): *Empetrum nigrum* L. [15, 25].

Equisetaceae (1): *Equisetum arvense* L. [50].

Ericaceae (6): *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Soreng., *Calluna vulgaris* (L.) Hill., *Monotropa uniflora* L., *Rhododendron dauricum* L., *Rh. fauriei* Franch, *Vaccinium vitis-idaea* L. [10, 14, 15, 34].

Euphorbiaceae (4): *Euphorbia hirta* L., *E. neriifolia* L., *Maprounea africana* Müll. Arg., *Tragia involucrate* L. [7, 51, 52].

Fabaceae (19): *Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Fisch, *A. persarum* Boiss. et Buhse, *Amorpha fruticosa* L. *Astragalus dasyanthus* L., *Cassia siamea* Lam., *Clitoria ternatea* L., *Cytisus scoparius* Link, *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth, *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., *E. velutina* Willd., *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, *Lotus corniculatus* L., *Pachyrrhizus erosus* (L.) Urban, *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst., *Piscidia piscipula* (L.) Sarg., *Sesbania grandiflora* Pers., *Sophora flavescens* Soland., *Trigonella foenum-graecum* L. [7, 8, 10, 14, 15, 18, 20, 26, 32, 34, 35, 40, 53 – 57, 71].

Himantaliaceae (1): *Himantalia elongata* (L.) S.F.Gray [58].

Gentianaceae (1): *Canscora decussata* Roem. et Schult. [10, 20].

Geraniaceae (1): *Geranium macrorrhizum* L. [37].

Ginkgoaceae (1): *Ginkgo biloba* L. [7, 18, 40, 64, 65].

Lamiaceae (38): *Ballota nigra* L., *Betonica officinalis* L., *Hyptis spicigera* Lam., *Hyssopus officinalis* L., *Lagochilus inebrians* Bunge., *Lallemantia royleana* (Benth.) Benth., *Lamium album* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Leonurus cardiaca* L., *L. lanatus* (L.) Pers., *L. quinquelobatus* Gilib., *Lycopus europeus* L., *L. virginicus* L., *Majorana hortensis* Moench., *Melissa officinalis* L., *Mentha arvensis* L., *M. piperita* L., *M. pulegium* L., *Nepeta cataria* L., *N. persica* Boiss., *Ocimum gratissimum* L., *O. sanctum* L., *Origanum vulgare* L., *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, *Phlomis pungens* Willd., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia elegans* Vahl, *S. multiorrhiza* Bunge, *S. officinalis* L., *S. reuterana* Boiss, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *S. galericulata* L., *S. Leateriflora* L., *Stachys baicalensis* Fisch. ex Benth., *S. betonicaeflora* Rupr., *S. lavandulifolia* Vahl., *Thymus linearis* Benth., *Th. vulgaris* L. [7, 8, 10, 14, 15, 18, 20, 24, 26, 32, 34, 37, 40, 66 – 81, 229].

Lauraceae (1): *Aniba riparia* (Nees) Mez. [7].

- Loranthaceae (1):** *Viscum album* L. [14, 34].
- Lythraceae (1):** *Lawsonia inermis* L. [14].
- Magnoliaceae (3):** *Magnolia dealbata* Zucc., *M. obovata* Thunb., *M. officinalis* Rend. et Wils. [7, 18, 40, 82, 83].
- Malpighiaceae (1):** *Galphimia glauca* Cav. [7].
- Marcgraviaceae (1):** *Souroubea sympetala* Gilg. [84].
- Melanthiaceae (1):** *Aletris farinosa* L. [10, 20].
- Meliaceae (1):** *Azadirachta indica* A. Juss. [7, 40].
- Menispermaceae (5):** *Cissampelos mucronata* A. Rich., *Menispermum dahuricum* L., *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils., *Stephania glabra* (Roxb.) Miers, *S. tetrandra* S. Moore [10, 15, 20, 85, 86].
- Menyanthaceae (1):** *Menyanthes trifoliata* L. [14, 15].
- Mimosaceae (2):** *Albizia lebbek* (L.) Benth., *A. julibrissin* Durazzini [7].
- Moraceae (3):** *Cecropia glazioui* Sneth, *Dorstenia arifolia* Lam., *Ficus platyphylla* Del. [7, 87, 88].
- Myrtaceae (1):** *Myrtus communis* L. [24].
- Nelumbonaceae (1):** *Nelumbo nucifera* Gaertn. [10].
- Nymphaeaceae (1):** *Nymphaea alba* L. [15].
- Onagraceae (1):** *Chamaenerium angustifolium* L. Scop. [14].
- Orchidaceae (3):** *Cypripedium pubescens* Willd., *Gastrodia elata* Blume, *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex Don [7, 10, 18, 20].
- Orobanchaceae (1):** *Cistanche deserticola* Ma. (CD) [89].
- Paeoniaceae (4):** *Paeonia albiflora* Pall., *P. anomala* L., *P. emodi* Wall., *P. suffruticosa* Andrews [7, 10, 14, 15, 26, 34, 71].
- Papaveraceae (4):** *Corydalis cava* Schweigg. et Korte, *C. turtschaninovii* Bassler., *Eschscholtzia californica* Cham., *Papaver rhoeas* L. [7, 15, 18, 20, 24, 25, 71, 90].
- Parnassiaceae (1):** *Parnassia palustris* L. [15].
- Passifloraceae (6 видів, 1 підвид):** *Passiflora actinia* Hooker, *P. alata* Dryander, *P. coerulea* L., *P. edulis* L., *P. edulis f. flavicarpa* O. Deg, *P. incarnata* L., *P. quadrangularis* L. [7, 10, 14, 15, 18, 26, 34, 35, 37, 40, 60, 71, 91 – 101].
- Pinaceae (1):** *Abies pindrow* Royle [7, 40, 102].
- Piperaceae (3):** *Macropiper latifolium* (L. f.) Miq., *M. methysticum* (G. Forst) Hook et Arnote, *Piper methysticum* Foster [7, 14, 18, 37, 40, 77, 92, 95].
- Poaceae (2):** *Avena sativa* L., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. [10, 14, 15, 77, 103, 104].
- Polemoniaceae (1):** *Polemonium coeruleum* L. [10, 15, 25, 26, 34].
- Polygalaceae (2):** *Polygala sabulosa* A.W. Bennett, *Securidaca longepedunculata* Fresen [105, 106].
- Primulaceae (2):** *Anagallis arvensis* L., *Primula veris* L. [10, 15, 25].
- Ranunculaceae (13):** *Actaea spicata* L., *Adonis vernalis* L., *Aquilegia vulgaris* L., *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. racemosa* (L.) Nutt., *Clematis chinensis* Osbeck, *Coptis chinensis* Franch., *Leptopyrum fumarioides* (L.) Reichb., *Nigella sativa* L., *Pulsatilla nigricans* Stoerck, *P. patens* (L.) P. Mill., *P. taurica* Juz., *P. vulgaris* Mill. [7, 10, 14, 15, 20, 26, 34, 71, 107, 230].
- Rhamnaceae (2):** *Zizyphus jujube* Mill. var. *inermis* Rehder, *Z. vulgaris* Lamark var. *spinosa* Bunge [7, 10, 24, 32, 40, 71, 108].
- Rosaceae (9):** *Amygdalus communis* L., *Armeniaca mume* Siebold, *Crathaegus oxyacantha* L., *C. monogyna* Jacq., *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Laurocerasus officinalis* M. Roem., *Padus serotina* (Ehrh.) Agardh., *Potentilla argentea* L., *Rubus brasiliensis* Marit [7, 10, 14, 15, 20, 26, 34, 35, 40, 71, 109, 110].
- Rubiaceae (5):** *Asperula odorata* L., *Galium odoratum* (L.) Scop., *G. verum* L., *Sarcocephalus latifolius* (Sm.) E.A. Bruce, *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks [7, 15, 18, 25, 71, 111].
- Rutaceae (6):** *Casimiroa edulis* Llave et Lex., *Citrus aurantium* L. subsp. *amara* L., *C. paradisi* var. *Duncan*, *C. sinensis* (L.) Osbeck., *Ruta chalepensis* L., *R. graveolens* L. [7, 10, 14, 15, 18, 71, 104, 112 – 114].
- Salicaceae (3):** *Salix alba* L., *S. caprea* L., *S. purpurea* L. [14, 15].
- Salvadoraceae (1):** *Salvadora persica* L. [115].
- Sapindaceae (2):** *Euphoria longana* Lam., *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. [7, 40, 116].
- Schisandraceae (1):** *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail. [117].
- Scrophulariaceae (2):** *Bacopa monnieri* (L.) Penn., *Linaria vulgaris* Mill. [7, 34, 77].
- Simaroubaceae (1):** *Eurycoma longifolia* Jack [7, 40].
- Solanaceae (6):** *Datura innoxia* Mill., *Hyoscyamus niger* L., *Physalis alkekengi* L., *Scopolia carniolica* Jacq., *Solanum nigrum* L., *Withania somnifera* (L.) Dunal. [7, 10, 14, 15, 18, 20, 40, 71].
- Theaceae (2):** *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl., *T. sylvatica* Schlttdl. et Cham. [104, 118, 119].
- Tiliaceae (4):** *Tilia americana* L., *T. cordata* Mill., *T. platyphyllos* Scop., *T. tomentosa* Moench [15, 18, 40, 60, 71, 120 – 122].
- Turneraceae (1):** *Turnera aphrodisiaca* Ward. [7, 18, 123].
- Valerianaceae (9):** *Centranthus ruber* (L.) DC., *Nardostachys jatamansi* D.C., *Patrinia intermedia* (Hornem.) Roem et Schult., *P. scabiosifolia* Fisch., *Valeriana edulis* ssp. *procera* Mey, *V. japonica* Miq., *V. officinalis* L., *V. thalictroides* Graebn.,

V. wallichii DC [7, 10, 14, 15, 18, 26, 34, 35, 37, 71, 92, 124-128, 134, 226-228].

Verbenaceae (7): *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke, *A. triphylla* (L'Herit.) Britt., *Lantana trifolia* L., *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton et P.Wilson, *L. citriodora* Kunth, *Verbena officinalis* L., *Vitex negundo* L. [7, 15, 18, 20, 24, 71, 129–132].

Vitaceae (1): *Cissus sicyoides* L. (CS) [133].

Zingiberaceae (1): *Zingiber officinale* Rosc. [7, 32].

Zygophyllaceae (1): *Peganum harmala* L. [15].

Fungi, Eumycota — Царство Гриби

Clavicipitaceae (1): *Claviceps purpurea* Tulasne [10, 14, 15].

Ganodermataceae (2): *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *G. tsugae* Murrill [63].

Polyporaceae (1): *Poria cocos* F.A. Wolf [10, 20, 32].

В експерименті седативну дію встановлюють на стресованих тваринах переважно за методом «відкрите поле», анксиолітичну — за тестом хрестоподібного піднесеного лабіринту та за іншими методиками [7, 34, 36, 39, 226]. Доцільно докладніше розглянути особливості психотропних властивостей окремих ЛР як на прикладі видів, добре відомих своєю седативною активністю, так і на прикладі видів, для яких ці ефекти є дещо несподіваними.

Типовим представником першої групи видів є собача кропива п'ятилопатева (*Leonurus quinquelobatus*). Її седативну активність доведено у багатьох дослідженнях [10, 15, 26, 34]. У дозах, менших за седативні, витяги з даної рослинної сировини виявляють анксиолітичний ефект. Це стосується також масляного екстракту трави (іридолу) в дозах 0.6 мг/кг та 1.2 мг/кг, у перерахунку на вміст суми іридоїдів [70].

Пасифлора червонувата (*Passiflora incarnata*) (*Passifloraceae*) також відома своїми седативними, а також снодійними та спазмолітичними властивостями. Анксиолітичну дію виявляють водний і водно-спиртовий екстракти надземної частини ((375-400) мг/кг); метанольний екстракт листя (100 мг/кг), пагонів (125 мг/кг), квіток (200 мг/кг) і всієї рослини (300 мг/кг) [7, 10, 14, 15, 18, 26, 34, 35, 37, 40, 71, 91-95, 101]. Для дії ЛР роду *Passiflora* L. встановлено численні фітофармакологічні особливості. Так, корені та квітки *Passiflora incarnata* розглядають як недоцільні домішки, наявність яких у вихідній сировині призводить до збільшення ефективної анксиолітичної дози препарату [94]. Водний екстракт *Passiflora edulis*. виявляє анксиолітичний ефект без впливу на координацію рухів, тим часом як флавоноїдна фракція зменшує

тривожність тварин, але в той же час порушує координацію [60]. Анксиолітичні дози екстракту надземної частини *Passiflora edulis f. flavicarpa* залежать від екстрагенту (для спиртового екстракту (300-400) мг/кг, для водного екстракту (200-300) мг/кг, для бутанольного екстракту 125 мг/кг та 200 мг/кг), при збільшенні дози дія змінюється на седативну (бутанольний екстракт у дозі 300 мг/кг) [100].

Препарати валеріани лікарської (*Valeriana officinalis*) виявляють загальну пригнічувальну дію на ЦНС, мають добре відомі седативні властивості. Анксиолітичну активність виявляє спиртовий екстракт (3 мл/кг) [10, 14, 15, 18, 26, 35, 37, 71, 92, 124, 134], а також метанольний екстракт і фракція етанольного екстракту (патентований екстракт «phytofin Valerian 368»), що додатково зменшує депресивність тварин [135].

Проте психотропні властивості лікарських рослин часто дисоціюють. Так, у женьшеню (*Panax ginseng*) добре відома стимулювальна дія на ЦНС сполучається з анксиолітичною. Транквілізуючий вплив властивий екстракту, одержаному при дії високих температур, та його бутанольній фракції (50 мг/кг); бутанольній фракції екстракту, одержаного при температурі (98-100) °C (100 мг/кг); порошку кореню (300 мг/кг; 600 мг/кг і 1200 мг/кг, внутрішньошлунково) [7, 29-31]. БАР *Panax quinquefolium* модулюють вплив лігандів ГАМК-А-рецепторів, посилюють ГАМК-ергічну нейротрансмісію [33].

Гінкго дволопатева (*Ginkgo biloba*) має загальновідомі ноотропні та церебропротекторні властивості, але поряд із психоаналептичними виявляє і психолептичні ефекти. Анксиолітична дія виявляється за тестами хрестоподібного піднесеного лабіринту (екстракт у дозі (63-1000) мг/кг, максимальна дія визначається в дозі 125 мг/кг), споживання води, що карається ((500-1000) мг/кг у шлунок), і соціальної взаємодії (96 мг/кг). Вона не блокується флумазенілом. Седативний ефект гінкго доведено у вищих дозах у тесті «відкрите поле» (екстракт, (500-1000) мг/кг у шлунок) [7, 18, 40, 64, 65].

Хвощ польовий (*Equisetum arvense*) має не лише добре відомі сечогінні та в'язучі [10], але й седативні властивості (водно-спиртовий екстракт у дозах 200 мг/кг і 400 мг/кг) [50].

Препарати звіробію звичайного (*Hypericum perforatum*) характеризуються не тільки протизапальною, антимікробною, антидепресивною, але й психолептичною дією. Анксиолітичний ефект, пов'язаний із впливом на ГАМК-А-бензодіазепін-барбітуровий рецепторний комплекс, за різними тестами виявляють стандартизований екстракт (300 мг/кг при курсовому введенні у шлунок) і метанольний екстракт

(10 мг/кг внутрішньоочеревинно); при збільшенні дози до 200 мг/кг останній спричинює седацію [7, 40, 59-62]. Слід зазначити, що аналогічне явище (поява седативної дії при введенні фітопрепаратів у дозах, вищих за анксиолітичні) описано у багатьох вищезитованих роботах і може розглядатися як загальна закономірність дії рослинних засобів.

2. Біологічно активні речовини, що забезпечують седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності лікарських рослин, механізми їхньої дії

Питання щодо діючих речовин психотропних ЛР заслуговує на докладний розгляд. БАР

ЛР, що наведено у даному огляді, ілюстративно узагальнено в Таблиці.

Так, велику увагу на сьогодні привертають рослинні фенольні сполуки, насамперед флавоноїди, психотропна активність яких є значно менш відомою порівняно з іншими ефектами (такими як антиоксидантні, протизапальні тощо). Анксиолітичні властивості флавоноїдів вперше встановлені Paladini A.C. із співавт у 1990 році. Флавоноїди та їх напівсинтетичні аналоги є лігандами бензодіазепінових сайтів ГАМК-рецепторів [37, 38, 139-144]. Ряд таких сполук виділено із ЛР, що використовують для усунення тривожності у народній медицині. Аментофлавонол — перша відома речовина, що

Таблиця

Біологічно активні речовини рослинного походження, що виявляють седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності

Група біологічно активних речовин	Представник
аліфатичні вуглеводні та їх глікозиди	2-метил-3-бутен-2-ол
монотерпени	валтрат, ацетоксивалтрат, балдриналь, гомобалдриналь
	валеренова кислота
	ізопулегол
	β -каріофілен
	β -кубібен
	лімонен
	міоцен
	(R)-(-)-ліналоол
	непеталактон
	непеталова кислота
	пеоніфлорин
	β -селінен
	цитраль
сесквітерпенові лактони	лактокопікрин лактоцин
дитерпени	гінкголід А
тритерпени	α -амірин, -амірин
	гальфамін В
	гінсенозид Rb1 (per se та разом із гінсенозидами Rg5 та Rk), гінсенозид Rg3, гінсенозид Rh2
	сайкогенін А
стероїди	β -ситостерол
похідні бензопірану	баракол
похідні α -пірону	дигідростирил-2-пірони та стирил-2-пірони <i>Polygala sabulosa</i>
	кава-лактони <i>Piper methysticum</i>
похідні γ -пірону	мальтол, етилмальтол
	якаранон
прості феноли	похідні гінгколової кислоти — 6-алкілсаліцилати (п-тридецил-, п-пентадецил-, п-гептадецил-, п-пентадецинил-, п-гептадецинил-саліцилати)
	розавін
	салідрозид
	сірингін
гідроксикоричні кислоти та їх похідні	кавова кислота
	розмаринова кислота

Таблиця (продовження)

флавоноїди	6-метилапігенін
	6-гідроксифлавіон
	аморфін
	апигенін
	байкалін
	вогонін
	(-)-геспередин
	діокленол
	ізоорієнтин
	кемпферол
	лінарин
	лютеолін
	лютеолін-7-диглюкуронід
	орієнтин
	скутелярин
	флавіон
хризин	
цирсиліол	
лігнани, неолігнани та їх похідні	гонокіол
	обоватол
	янгамбін
дифеноли	магнолол
інші фенольні сполуки	Δ-транс-тетрагідроканнабінол
алкалоїди й амід	алстонін
	берберин
	L-дицентрин
	D-ізокоридин
	коринолін
	нуциферин
	протопін
	піперин
	піплартин
	санйонін-А
	скополамін
	тетрагідроберберин
	d,l-тетрагідропаальматин
нуклеозиди	аденозин
амінокислоти	ГАМК
похідні тираміну	рипарин I, рипарин II, рипарин III

не містить у молекулі атому азоту, з високою афінністю до бензодіазепінових рецепторів *in vitro* [139, 140]. Біфлавоноїди *Ginkgo biloba* – похідні аментофлавіону: білобетин, гінкгетин, ізогінкгетин та сціадопітизин мають набагато менший афінитет до цих рецепторів. Перший мономерний флавоноїд, високоафінний до бензодіазепінових рецепторів та активний *in vivo* – хризин (виділений із *Passiflora coerulea*), близький за анксиолітичною дією до діазепаму, але вигідно позбавлений седативної та міорелаксантакої активності в анксиолітичних дозах [37, 140, 141]. Аналогічні властивості мають сам флавіон [140, 141], 6-гідроксифлавіони [142], апі-

генін [37, 38, 140, 141] та його похідні, наприклад 6-метилапігенін [146]. У дозі 2 мг/кг апігенін за анксиолітичною дією наближується до діазепаму. Значний седативний ефект з'являється у вищих дозах ((1525) мг/кг), за яких анксиолітична активність зменшується [38, 123]. Таким чином, деякі флавоноїди мають подібний до бензодіазепінів механізм дії за більш сприятливої розбіжності анксиолітичних та седативних доз.

Лігандами бензодіазепінових рецепторів також є гіспідулін [147], 6,2'-дигідрокси-5,7,8,6'-тетраметоксифлавіон [148], лютеолін-7-диглюкуронід [129], вогонін [149], байкалін і байкалеїн [76].

Незважаючи на структурну подібність лютеоліну до анксиолітичних флавоноїдів апігеніну, хризину та вогоніну, він має низьку афінність до бензодіазепінових сайтів ГАМК-рецепторів. Водночас, анксиолітичні властивості лютеоліну доведено *in vivo*, тому вірогідний вплив на інші нейротрансмітерні системи або взаємодія метаболітів лютеоліну з ГАМК-рецепторами [150]. Структурному аналогу апігеніну кверцетину, а також кемпферолу не властива анксиолітична дія та здатність до зв'язування із зазначеними рецепторами [121, 140, 143]. Проте [21] вказує на анксиолітичну дію кемпферолу, яку усуває флумазенил.

Серед флавоноїдів є не тільки агоністи, але й антагоністи бензодіазепінових рецепторів, можлива селективність щодо їх підтипу. Байкалін, що у дозах (7.5-30) мг/кг виявляє анксиолітичний ефект *in vivo* без седації та міорелаксації [137], переважно виявляє афінність до α -2 та α -3 субтипів ГАМК-А-рецепторів (на відміну від діазепаму, що впливає переважно на α -1 та α -5 субтипи) [151]. Цирсиліол є частково селективним відносно бензодіазепінових рецепторів типу I [152]. 5,7,2'-тригідрокси-6,8-диметоксифлаван та вогонін — часткові агоністи [140, 148, 153], останній виявляє анксиолітичну активність без седації та міорелаксації [154], що блокується антагоністом бензодіазепінових рецепторів флумазенилом [149]. Флавоноїд ороксилін А є селективним антагоністом бензодіазепінових рецепторів типу II (зменшує зв'язування флунітразепаму), у дозах (3.75-60) мг/кг не змінює поведінкові реакції тварин, чутливі до дії бензодіазепінів, селективно усуває вплив діазепаму на координацію рухів і його анксиолітичний, міорелаксантийний, але не седативний і протисудомний ефекти [140, 153]. Скрофулеїн та динатин є антагоністами та частковими агоністами бензодіазепінових рецепторів без анксиолітичної та седативної дії [143, 144, 155]. Згідно з [154] виявлено 17 похідних флавоноїдів, що пригнічують зв'язування [3H]діазепаму з бензодіазепіновими рецепторами, найактивнішим антагоністом є 6-метилфлаван (конкурентний інгібітор).

Слід зазначити, що в одному виді лікарської рослинної сировини можуть бути наявними сполуки різноспрямованої психотропної дії. Кінцевий результат взаємодії такої суми БАР із організмом буде обумовлений численними факторами, у тому числі фармакокінетичними. Наприклад, серед психотропних флавоноїдів *Scutellaria baicalensis* Georgi., що міститься у вищенаведеному переліку седативних та анксиолітичних ЛР, наявні як агоністи, так і анта-

гоністи бензодіазепінових рецепторів, що розглянуто в [140, 153].

Значну увагу привертають алостеричні сайти ГАМК-А-бензодіазепін-барбітурового рецепторного комплексу, відмінні від бензодіазепінових рецепторів. При цьому вплив деяких флавоноїдів, у тому числі анксиолітичних, на даний комплекс є неоднозначним. Кверцетин, апігенін, морин, хризин і флаван інгібують відповіді, зумовлені $\alpha(1)\beta(1)\gamma(2s)$ ГАМК(А) та $\rho(1)$ ГАМК(С) рецепторами. Анксиолітичні та седативні флавоноїди, такі як хризин та апігенін не потенціюють відповідь $\alpha(1)\beta(1)\gamma(2s)$ ГАМК(А)-рецепторів, але виявляють антагонізм із ними [156]. Апігенін зв'язується із центральним сайтом бензодіазепінового рецептору, але в подальшому зменшує вхід СГ, індукований ГАМК. Тому він закономірно зменшує латентний період судом, спричинених пікротоксином. При внутрішньоочеревинному введенні шурам апігенін знижує локомоторну активність, але не виявляє анксиолітичної дії в дослідгах [157] на відміну від результатів, зазначених у [38, 123, 141].

Модують вплив лігандів ГАМК-А рецепторів і збільшують ГАМК-ергічну нейротрансмісію стереоізомери 3-ацетокси-4'-метоксифлавану ($\alpha(1,2,3,5)\beta(2)\gamma(2L)$) та $\alpha(1)\beta(2)$ ГАМК-А рецептори [158], гіспідулін [147], гесперидин [146, 159]. Анксиолітичний ефект останнього також обумовлений взаємодією з аденозиновими рецепторами [146, 159]. Помірну афінність до цих рецепторів має також напівсинтетичний флавоноїд 6,3'-динітрофлаван [143-145]. Гесперидин і лінарин виявляють седативну активність і покращують сон [126, 134, 160]. Седативну дію виявляють також цирсиліол [152], skutелярин та аморфін [34], анксиолітичну — діокленол [53], орієнтин та ізоорієнтин (при збільшенні дози дія змінюється на седативну) [100, 161].

С-флавоноїдний глікозид спінозин посилює дію барбітуратів через серотонінергічні механізми, а саме через 5-НТ(1а) рецептори [162].

Із флавоноїдами певною мірою пов'язують анксиолітичну дію таких ЛР: *Chamomilla recutita* (апігенін) [38], *Turnera aphrodisiaca* (апігенін) [123], *Valeriana officinalis* та *Valeriana wallichii* (6-метилапігенін, гесперидин, лінарин) [104, 134, 146, 160], *Scutellaria lateriflora* (байкалін і байкалеїн) [76], *Tilia americana var. mexicana* (тілірозид, кверцетин, кверцитрин, кемпферол та їх глікозиди) [122], *Cecropia glaziovii* (орієнтин, ізоорієнтин) [7], а також *Cissus sicyoides* (CS) [133], *Stachys lavandulifolia* [73], *Passiflora incarnata* [91], *Erythrina velutina* [7], *Aethusa cynapium* L. [16], *Apocynum venetum* L. (анксиолітичну дію

екстракту цієї ЛР блокує антагоніст 5-НТ(1а) рецепторів [21].

Серед інших фенольних сполук також наявні речовини із верифікованою психотропною дією. Так, серед простих фенолів анксиолітичну дію виявляють розавін і сиригін [28], седативно-гіпнолітичну — салідрозид [163]. Антидепресивний та анксиолітичний ефекти доведено для розмаринової та кавової кислот (та екстракту *Perilla frutescens* Britton var. *acuta*, що їх вміщує), механізм обох ефектів пов'язаний із модуляцією α_1 -адренорецепторної медіаторної сигнальної трансдукції [80]. Етиловий ефір кавової кислоти є лігандом бензодіазепінових рецепторів [140, 152]. 4-гідроксибензиловий спирт та 4-гідроксибензальдегід спричиняють анксиоліз через дію на бензодіазепінові, ГАМК-А та 5-НТ(1а)-рецептори [7]. Пеонол із *Paeonia x suffruticosa* Andrews за вираженістю анксиолітичної дії в експерименті наближається до діазепаму [7].

У похідних фуранокумарину — фелоптерину, б'якангеліколу, імператорину — виявлено афінність до ГАМК-А-рецепторів. Найбільш активним є фелоптерин — частковий агоніст бензодіазепінових рецепторів ГАМК-А комплексу, що інгібує зв'язування з ними [3Н]діазепаму [155].

Седативний ефект виявляє також лігнан янгамбін [164]. Анксиолітична дія похідного лігнанів обоватолу реалізується через активацію Cl^- -каналів, пов'язаних із ГАМК-А-бензодіазепінбарбітуровим рецепторним комплексом [165]. Із цим самим комплексом асоційована анксиолітична, седативна, міорелаксанта активність неолігнану гонокіолу (із *Magnolia officinalis*) [166]. Вірогідна взаємодія гонокіолу з невідомим дотепер сайтом зазначеного комплексу, модуляція відповіді на зв'язування ГАМК (підвищення афінності). Результатом є активація Cl^- -каналів, подібна до впливу діазепаму [155]. У той же час відомо, що антагоніст бензодіазепінових рецепторів флумазеніл блокує анксиолітичну дію гонокіолу. Аналогічні гонокіолу властивості виявляє дифенольна сполука магнолол [155, 166]. Для лігнану гідроксипінорезінолу встановлено афінність до бензодіазепінових рецепторів [134].

Седативний ефект *Cannabis sativa* пов'язаний із канабіноїдами (тетрагідроканабінолом, канабідіолом) й асоційований із системою простагліцинів. Седативна дія Δ^1 -транс-тетрагідроканабінолу та препаратів зазначеної ЛР блокується аспірином, відновлюється за введення ПГ E_2 [167].

Дитерпенові хінони *Salvia multiorrhiza* зменшують зв'язування флунітразепаму із бензо-

діазепіновими рецепторами. Особливо активним є мілтірон, що, на відміну від діазепаму, є частковим агоністом бензодіазепінових рецепторів [168].

Численні ЛР із вищенаведеного переліку є джерелом ефірних олій. Ефірні олії ЛР роду *Citrus*, ЛР родини *Lamiaceae* (*Lavandula angustifolia*, *Mentha sp.*, *Melissa sp.*) та інших родин (*Aloysia sp.*, *Cymbopogon citrates*), а також препарати *Cissus sicyoides* L. використовуються для усунення тривожних станів [18, 133, 169]. В експерименті підтверджено анксиолітичні властивості компоненту цих ЛР монотерпеноїду ліналоолу, не пов'язані зі впливом на ГАМК-рецептори та властиві (R)-(-)-ліналоолу, але не (S)-(+)-ліналоолу [170, 171]. Ліналоол також пригнічує глутаматергічну нейротрансмісію у ЦНС і виявляє седативну дію [169]. Активні анксиолітичні БАР *Annona cherimola* Mill., поряд із ліналоолом, — β -каріофілен, β -селінен, β -кубібен [7].

У той же час, (+)-ментол і подібні за структурою монотерпеноїди посилюють дію ГАМК, дія зменшується в ряду (+)-ментол > (-)-ментол > (-)-борнеол >> (-)-ментон = енантіомери камфори > енантіомери карвону. (+)-ментол також збільшує вплив гліцину на його рецептори [172]. Вплив малих концентрацій ГАМК на рецептори та силу відповіді нейронів зростає у присутності (+)-борнеолу, (-)-борнеолу. Дія залежить від концентрації та не блокується флумазенілом; ізоборнеол, (-)-борнілацетат і камфора виявляють менш виражений вплив. За збільшення концентрації (+)- та (-)-борнеол прямо активують ГАМК-А-рецептори [173].

Седативну дію в експерименті виявляють цитраль, мірцен, лімонен [129], пеоніфлорин [174], анксиолітичну — ізопулегол [175], ефірна олія *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, що містить лігустілід [176].

Humulus lupulus традиційно застосовується як седативний засіб. Його активність може бути пов'язана з компонентом ефірної олії 2-метил-3-бутен-2-олом, на вміст якого в препаратах хмелю звичайного суттєво впливають технологічні фактори [177].

Ефірні олії кореневищ *Acorus gramineus* і коренів *Valeriana officinalis* пригнічують ГАМК-трансаміназу [178, 179], що нарівні з глутаматдекарбоксилазою визначає пул ГАМК. Відповідно, на тлі ефірної олії *Acorus gramineus* у тканинах мозку зростає рівень ГАМК та зменшується рівень глутамату [179]. БАР водного екстракту кореневищ даної ЛР специфічно зв'язуються із D1 та D2-рецепторами у стріатумі, що важливо з огляду на тісний взаємозв'язок між дофамінергічною та ГАМК-ергічною системами [27].

Сedaцію в експерименті спричиняють ефірні олії *Acorus calamus* [18], *Acorus gramineus* [179], *Hyssopus officinalis* [180], *Lavandula angustifolia* [180], *Nepeta cataria* [181], *Valeriana officinalis* [B182]; анксиолітичну — ефірні олії *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [18, 176], *Citrus sinensis* [183]; анксиолітичну та седативну — ефірні олії *Citrus aurantium* [112], *Symbopogon citratus* [103], *Lippia alba* [129].

Важливість синергізму для виявлення фармакологічної активності рослинних препаратів добре ілюструє приклад *Ocimum gratissimum*. Седативну дію виявляють ефірні олії цієї ЛР, отримані протягом всього періоду вегетації, протисудомну — тільки ефірні олії весняного збору, що містять значну кількість сесквітерпенів (основний — транс-каріофілен) поряд із основними компонентами евгенолом та 1,8-цинеолом. При цьому, на відміну від ефірної олії, ці компоненти *per se* не чинять седативного ефекту, і, навіть у суміші, — протисудомної дії. Тільки суміш евгенолу, 1,8-цинеолу та транс-каріофілену у співвідношеннях як у природній ефірній олії весняного збору збільшує тривалість барбітурового сну [74,138].

Седативна дія властива сесквітерпеновим лактонам лактуцину та лактукопикрину (але не 11 β ,13-дигідролактучину), що містяться в *Lactuca virosa* та *Cichorium intybus* [39].

Експериментально верифікована анксиолітична дія препаратів *Ginkgo biloba*, про яку йшлося вище, пов'язана із дитерпеноїдами, а саме з гінкголідом А (але не з гінкголідом-В, гінкголідом-С та сесквітерпеном білобалідом). При цьому гінкголід А відрізняється від сумарного екстракту гінкго відсутністю сedaції при збільшенні дози [64]. Водночас для гінкголідів А, В, С і білобаліду встановлений антагонізм до $\alpha(1)\beta(2)\gamma(2L)$ -ГАМК(А) рецепторів, блокування прямої дії ГАМК [184]. Серед БАР гінкго анксиолітичний ефект в експерименті також виявляють похідні гінкголової кислоти — 6-алкілсаліцилати (*n*-тридецил-, *n*-пентадецил-, *n*-гептадецил-, *n*-пентадециніл- та *n*-гептадецинілсаліцилати) [185].

Вище також розглянуто анксиолітичні властивості препаратів коренів женьшеню. Вони можуть бути значною мірою асоційовані із тритерпеновими сапонінами — гінсенозидами Rb1, Rg1, Rg5, Rg3 та Rh2, але не з Rg3-R та Rg3-S. Мішенями гінсенозидів Rg3 та Rh2 є ГАМК-А-бензодіазепін-барбітуровий рецепторний комплекс і серотонінові рецептори [29-31].

Значний седативний ефект *in vivo* встановлений у тритерпенового сапоніну сайкогеніну А та сумарної фракції сапонінів із коренів *Vupleurum falcatum* [17], гальфіміну В [186], сапонінів α -

β -амірину, що також виявляють анксиолітичну дію, яка блокується флумазенилом [187].

Екстракти *Souroubea sympetala* (*Marcgraviaceae*) зменшують прояви тривожності *in vivo*, що асоційовано із бетуліновою кислотою (однак взаємозв'язок між вмістом цієї БАР і вираженістю анксиолітичної дії не завжди є однозначним) [84].

Нор-секотритерпен гальфімін В селективно пригнічує дофамінергічні нейрони вентральної тегментальної ділянки у щурів, що реалізується через вплив на K⁺-канали та ГАМК-А-рецептори [7].

Терпенові сполуки є діючими речовинами препаратів *Erythrina velutina* [7], *Cecropia glazioui* [7], *Stachys lavandulifolia* [73]. Анксиолітичну дію *Eurycoma longifolia* пов'язують із квасиноїдами та іншими терпеноїдами [40].

У групі стероїдів перспективною для психофармакологічного вивчення сполукою є β -ситостерол. Він долучається до реалізації анксиолітичної та седативної дії неочищеного екстракту та фракції жирних кислот суцвіть *Tilia americana* [120]. Із гліковитанолідами асоціюють анксиолітичні властивості препаратів *Withania somnifera* [40].

Баракол, що є похідним бензопірану та міститься у *Cassia siamea*, виявляє модульований вплив на дофамінергічну систему. Не змінюючи базальний рівень дофаміну та його метаболітів у стріатумі, він зменшує спричинене метамфетаміном вивільнення дофаміну та зростання його обігу, відповідно зменшується гіперактивність тварин [40].

Серед похідних γ -пірону седативна дія властива мальтолу та етилмальтолу (виділеним із *Passiflora incarnata* L.) [188], седативна й анксиолітична — якаранону [119]. Седативний, снодійний та анксиолітичний ефекти в експерименті виявляє етилацетатна фракція *Polygala sabulosa* A.W. Bennett. Анксиолітиками також є дигідростирил-2-пірони та стирил-2-пірони, що містяться у даній ЛР та структурно подібні до кава-лактонів. Ці сполуки взаємодіють із бензодіазепіновими сайтами ГАМК-рецепторів, встановлено конкурентний характер взаємодії зі значним зменшенням афінності, але не максимального ступіню зв'язування флунітразепаму [105].

Кава-лактони — похідні α -пірону — є основними діючими речовинами *Piper methysticum*, забороненого до застосування в Україні через гепатотоксичність [95]. Однак механізми дії цієї ЛР є настільки полімодальними, а спектр психотропної дії доволі своєрідним (транквілізуювальний ефект не тільки без ознак сedaції,

але й без погіршення когнітивних функцій), із відповідно давньою історією застосування, що не можна не зупинитися на стислому розгляді властивостей *Piper methysticum*. Кава-лактони у концентраціях, що досягаються *in vivo*, впливають на ГАМК-А-бензодіазепін-барбітуровий рецепторний комплекс, а також на Na^+ -канали й Ca^{2+} -канали [37, 189-192]. (+)каваїн, (+)дигідрокаваїн, (+)метистицин, (+)дегідрометистицин, янгонін збільшують ступінь зв'язування лігандів із ГАМК-А-рецептором, що не обумовлено взаємодією із бензодіазепіновим сайтом [189]. Екстракт *Piper methysticum* із високим вмістом лактонів виявляє аналогічну дію, причому збільшується кількість сайтів зв'язування, а не афінність [190]. Крім того, БАР даної ЛР здатні впливати на іонні канали. (\pm)каваїн та (+)метистицин взаємодіють із потенціалзалежними Na^+ -каналами та пролонгують їх неактивний стан [190]. Каваїн, дигідрокаваїн, дегідрометистицин неконкурентно інгібують зв'язування агоністів із рецепторним сайтом 2 потенціал-залежних Na^+ -каналів [192]. Каваїн і метистицин протидіють активації NMDA-рецепторів та/або потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів [193]. Крім того, кава-лактони впливають на зворотне захоплення норадреналіну та активність MAO_B — ці механізми асоційовані переважно з антидепресивною дією, однак можуть долучатися й до усунення тривожності. За вираженістю дії кава-лактони значно поступаються класичним антидепресантам, проте за розглянутого поєднання механізмів вірогідна адитивна дія, потенціювання [37]. Лактони *Piper methysticum* виявляють складний і неоднозначний вплив на дофамінергічну систему, характер впливу залежить від сполуки, дози та структури мозку [37]. Так, D,L-каваїн знижує рівень дофаміну в nucleus accumbens, при збільшенні дози не впливає на нього або збільшує його рівень. Дезметоксіянгонін збільшує рівень дофаміну в nucleus accumbens, янгонін — різко зменшує [37]. Метанольні екстракти листя та коренів *Piper methysticum* виявляють афінність до D_2 -рецепторів, а також до гістамінових рецепторів H_1 та H_2 [194]. Саме антагонізм із дофаміном може бути причиною побічної дії *Piper methysticum* — дискінезії, екстрапірамідних ефектів, зареєстрованих у клініці [37]. D,L-каваїн зменшує рівень серотоніну в nucleus accumbens [37]. (+)Каваїн пригнічує ЦОГ та утворення тромбоксану A_2 [195]. Активність останнього не обмежується впливом на гемодинаміку, він наявний у тканинах мозку й, можливо, інгібує ГАМК-А рецептори [37]. Слід зазначити, що механізми психотропної дії

фітопрепаратів, пов'язаної із системою простаноїдів, досліджено недостатньо, хоча вплив на синтез тромбоксану властивий багатьом фітопрепаратам [196].

Седативний ефект виявляє протопін, один із найбільш поширених алкалоїдів, а також тетрагідроберберин і d,l-тетрагідропальматин, l-тетрагідропальматин (ротундин), D-ізокоридин, L-дицентрин, коринолін [174]. D,l-тетрагідропальматин є лігандом бензодіазепінових рецепторів, впливає на дофамінергічну систему та виявляє також анксиолітичну дію (в дозах, менших за седативні) [140]. Анксиолітичні властивості встановлені також для берберину [197], піпартину [198], седативні — для скополаміну [199], піперину [200]. Берберин зменшує серотонінергічні впливи, оскільки активує соматодендритичні 5-НТ(1a)-рецептори та інгібує постсинаптичні 5-НТ(1a)- та 5-НТ(2)-рецептори [197].

Серед алкалоїдів наявні сполуки зі впливом на ГАМК-А-бензодіазепін-барбітуровий рецепторний комплекс. Найвідомішим є d-бікукулін — антагоніст сайту зв'язування ГАМК (аналогічні властивості у сонгорину), що закономірно не має клінічного значення [140]. Спиртовий екстракт трави чистотілу посилює зв'язування [3Н]мусцимолу з рецепторами ГАМК-комплексу, але при збільшенні концентрації посилення змінюється інгібуванням. Алостерична модуляція ГАМК-комплексу не пов'язана з бензодіазепіновими рецепторами і переважно обумовлена протопіном, синергістами є алокриптопін і стиліопін. У той же час, хелеритрин і сангвінарин інгібують зв'язування мусцимолу, однак їх вміст в екстракті трави чистотілу у 500-1000 разів нижчий за необхідний для впливу на ГАМК-комплекс. Тому залишається відкритим питання про механізм психотропної активності сумарних витягів чистотілу [201].

ЛР родини *Annonaceae* (*Annona muricata* та інші) виявляють седативну дію завдяки апорфіновим алкалоїдам [202]. Потенціюють гексобарбіталовий сон фракції, одержані із плодів ююби (*Zizyphus vulgaris* Lamark var. *spinus*), циклопептидний алкалоїд санйонин-А та апорфіновий — нуциферин (дія цих речовин є адитивною), але не апорфіновий алкалоїд зізіфузин і тетрагідробензілізохіноліновий — коклаурин. Згідно зі старовинною китайською *Materia Medica* обжарювання плодів ююби посилює їх снодійні властивості. Це підтверджено сучасними дослідженнями: показано, що після термічної обробки циклопептидні алкалоїди перетворюються на більш активні стереохімічні ізомери [108].

Основний компонент *Zizyphus vulgaris* Lamark var. *spinus* ююбозид А зменшує глутматергіч-

ну трансмісію у гіпокампі через пригнічення кальмодуліну та Na^+ -каналів [40].

Потенціювання дії барбітуратів алкалоїдом тетрандрином посилюється при дії 5-гідрокситриптофану. У присутності тетрандрину інгібітор триптофангідроксилази не виявляє антагонізму із барбітуратом відносно снодійної активності [86].

Індольний алкалоїд альстонін — основний компонент багатьох ЛР родини *Arosupaseae*, що використовуються в емпіричній медицині Африки при психічних розладах. Альстонін виявив анксиолітичну активність, асоційовану із впливом на серотонінові рецептори (5-HT(2A/2C)), а також на глутаматні NMDA-рецептори [203].

Седативна й анксиолітична активність властиві похідним тираміну — рипарину I, II, III (із плодів *Aniba riparia* [204].

Слід зазначити, що речовини медіаторної дії можуть міститися у рослинних джерелах, але активність таких фітопрепаратів значною мірою буде залежати від фармакокінетичних чинників. Так, анксиолітичну дію *Euphoria longana* (30 мг/кг підшкірно) обумовлено аденозином [205]. Активність екстракту *Nigella sativa*, що підвищує трансмісію інгібіторних амінокислот (ГАМК, гліцин) і знижує — стимулювальних (глутамат, аспартат) у синапсах, певною мірою може бути асоційована з амінокислотами, які наявні в екстракті [107]. У складі деяких ЛР наявна ГАМК, наприклад вона міститься у значній кількості в екстрактах *Passiflora incarnata*, що збільшують ГАМК-А-потенціал у пірамідних нейронах гіпокампу *in vitro* (проте протисудомна активність екстрактів не корелює зі вмістом ГАМК) [206]. ГАМК поряд із глутаміном є однією з діючих речовин *Scutellaria lateriflora* [76]. І, зрештою, класичні седативні засоби — препарати валеріани лікарської — містять ГАМК у значній кількості [37, 207]. Однак дискусійним залишається питання щодо виявлення даних ефектів *in vivo* з огляду на проникність гематоенцефалічного бар'єру. Вважають можливим внесок глутаміну, але не ГАМК [37, 207], проте [206] вказує на проходження ГАМК крізь мембрани гематоенцефалітного бар'єру, а також ШКТ.

3. Важливість синергізму для виявлення седативної, анксиолітичної та спряжених видів фармакологічної активності лікарських рослин, значення біофармацевтичних чинників

Синергізм БАР психотропних ЛР може виявлятися як на рівні фармакокінетики, так і на рівні фармакодинаміки [37, 92, 95, 134, 136]. Так, наприклад, виражений анксиолітичний

ефект спостерігається при сумісному застосуванні флавоноїду байкаліну та алкалоїду *dl*-тетрагідропалматину в субанксиолітичних дозах [137]. Седативна активність властива ефірній олії *Ocimum gratissimum* й відсутня в основних її компонентів за їх введення *per se* [138].

Синергізм БАР фітопрепаратів значною мірою обумовлює неефективність спроб виділення однієї речовини або фракції, що перевищує за активністю сумарний препарат багатьох ЛР (у тому числі ЛР із впливом на ЦНС — валеріани, собачої кропиви, женьшеню, лимоннику, елеутерококку) [136].

З іншого боку, із ЛР виділено ряд сполук, що дозволили принципово змінити уявлення щодо розвитку патологічних процесів і шляхів впливу на їх розвиток. Серед таких сполук багато нейротропних (морфін, скополамін, резерпін, кофеїн, каваїн тощо).

Тому увага фітофармакології спрямована як на дослідження особливостей дії сумарних препаратів ЛР та їх біофармацевтичних закономірностей, так і на визначення діючих речовин та їх внесок в активність фітопрепаратів.

Наприклад, екстрактам *Valeriana officinalis* властива різноманітність механізмів впливу на ЦНС [37], яку доцільно розглянути докладніше з огляду на своєрідність синергічної композиції та велике практичне значення рослини. Так, екстракти валеріани лікарської, одержані за допомогою неполярних розчинників, посилюють відповідь ГАМК-А-рецепторів, на відміну від витягів, отриманих екстракцією полярними розчинниками. Модуляцію відповіді ГАМК-А-рецепторів асоціюють із валереновою кислотою [208], що діє на $\beta(2/3)$ субодиночку ГАМК-А рецептора (аналогічні властивості виявлено у похідних валеренової кислоти) [209]. Екстракти *Valeriana officinalis* у низьких концентраціях збільшують зв'язування флунітразепаму з бензодіазепіновими рецепторами, у високих — інгібують [210]. Валепотріати *Valeriana alliaritifolia* активують синтез ГАМК: підвищують її рівень у тканинах мозку, зменшують кількість глутамату й аспартату, а також активність АсАТ [211]. Екстракт *Valeriana officinalis* стимулює глутаматдекарбоксілазу [178], валеренова, валеренолова й ацетилвалеренолова кислоти пригнічують ферментативне розщеплення ГАМК [134]. Вплив БАР валеріани (*Valeriana officinalis* і *V. adscendens*) також реалізується на рівні синапсу: інтенсифікується вивільнення ГАМК із синапсом, порушується її зворотне захоплення, зменшується внутрішньоклітинний вміст амінокислот-нейротрансмітерів у синапсосомах [210, 212]. Ефекти валеренової

кислоти потенціє флавоноїд лінарин [126], дію гесперидину — 6-метилапігенін [146] (ці флавоноїди також збільшують ГАМК-ергічну нейротрансмісію, що розглянуто вище). БАР валеріани, у тому числі валеренова кислота, є агоністами 5-HT(5a) серотонінових рецепторів [213]. Валеренова кислота також сприяє виявленню анксиолітичних властивостей ГАМК, яка міститься в екстракті валеріани лікарської [124], що розглянуто вище. У досліджах Murphy K. зі співавт. зіставний анксиолітичний ефект спостерігали при введенні щурам екстракту валеріани (3 мл/кг), одночасного введення ГАМК і валеренової кислоти в дозах, відповідних їхньому вмісту у дослідженій дозі екстракту (3.6 мкг і 75 мкг, відповідно) або значно більшої дози (3 мг/кг) валеренової кислоти *per se* [123]. У реалізації седативної дії валеріани беруть участь нелеткі монотерпеноїди валепотріати. Вони є прекурсорами гомобалдиналю, що зменшує спонтанну рухову активність тварин. Структурно подібний до валепотріатів непеталактон із *Nepeta cataria* також виявляє седативний ефект [181]. Ізовалтрат є агоністом аденозинових рецепторів [214], лігнан гідроксипінорезинол — агоністом бензодіазепінових рецепторів [134]. Лігнан валеріани 4'-O-β-D-глікозил-9-O-(6"-деоксисахарозил)-олівіл є частковим агоністом A1-рецепторів [215], аналогічні властивості виявлено у екстрактив валеріани лікарської, одержаних за допомогою полярних розчинників, тимчасом як фракції, одержані за допомогою неполярних екстрагентів, виявляють оборотний антагонізм до зазначених рецепторів [214]. У екстрактив *Valeriana officinalis* встановлено також афінність до 5-HT(4e), 5-HT(6) та 5-HT(7)-рецепторів, а також до мелатонінових рецепторів ML1 та ML2 [216].

Таким чином, валеріана характеризується різноманітним БАР седативної дії. Значна варіабельність компонентів та їх кількісного вмісту, а також нестабільність деяких із них (наприклад валепотріатів) ускладнюють стандартизацію препаратів валеріани. Водночас, велика кількість діючих речовин забезпечує надійність седативного ефекту [134].

За таких умов особливого значення набуває біофармацевтичний фактор. Так, *in vitro* встановлено [217] суттєві розбіжності у вивільненні валеренової та гідроксивалеренової кислот із 5 різних видів таблеток, що містять витяги із валеріани. Сам вміст валеренової кислоти та її похідних, а також валепотріатів, у препаратах даної ЛР, наявних на фармацевтичному ринку, є досить варіабельним [218]. Проаналізовано доцільність використання валеренової

кислоти як маркера у фармакокінетичних дослідженнях [219]. Обґрунтовано раціональну технологію промислового одержання твердих лікарських форм на основі сухих і густих екстрактів, а також ліпофільного комплексу валеріани лікарської [227].

Крім валеріани лікарської, доцільно докладно розглянути особливості ще однієї широко вживаної рослини із седативними властивостями — собачої кропиви. Уявлення щодо її діючих речовин суперечливі. Найбільш імовірно, що це комплекс флавоноїдів, іридоїдів, алкалоїдів. У траві собачої кропиви ідентифіковано такі флавоноїди: гіперозид, кверцитрин, квінквелозид, рутин, кверцетин, космосин, ізокверцитрин, 7-глюкозид кверцетину (кверцимеритрин), 5,4'-дигідрокси-7-метоксифлавонон; алкалоїди леонурин, леонуридин (у сумі 0.4 %): протоалкалоїд стахїдрин; іридоїди: галіридозид, гарпагід, 8-ацетилгарпагід, аюгол, аюгозид. Також містяться дитерпени (гіркота марубін), фітол, тритерпен урсолова кислота (0.3 %), похідні гідроксикоричних кислот, фенологікозид, лавандуліфоліозид, дубильні речовини, ефірна олія ((0.003-0.09) %), до складу якої входять лімонен, ліналоол, каріофілен, α-гумулен, α-, β-пінен; органічні кислоти (у тому числі у вигляді солей калію), сапоніни, смоли, вітамін С, токоферол (останній виявлено у румунській популяції) та каротиноїди [10, 15, 69, 220]. Іридоїди розглядають як одні з основних діючих речовин трави собачої кропиви [70]. Російський препарат іридол — масляний екстракт із даної лікарської рослинної сировини — стандартизовано за іридоїдами. Він виявляє анксиолітичну дію в експерименті. Ефективність іридолу доведено клінічно. Він підвищує ефективність комплексної терапії артеріальної гіпертензії, що супроводжується психоемоційними порушеннями, дозволяє зменшити дози антигіпертензивних засобів. Дія настойки собачої кропиви порівняно з іридолом менш виражена [70, 221].

Отже, важливим сучасним завданням є вдосконалення технології одержання фітопрепаратів, використання доцільних лікарських форм. У цьому контексті привертає увагу традиційна лікарська рослинна сировина із седативною та анксиолітичною дією — трава собачої кропиви [10, 26, 34], особливості фітохімічного складу та психотропної дії якої стисло розглянуто вище. Як і у випадку іридолу, йдеться про перехід від настоек до лікарських форм, що не містять етанолу. У цьому випадку проблема вибору екстрагенту стосується не лише хімічного складу витягу та обмеження контингенту хворих, які можуть його застосовувати, але й здатності

самого етанолу впливати на ЦНС та модулювати вплив БАР ЛР [81]. Встановлено, що нова лікарська форма, що не містить етанолу, вигідно відрізняється від традиційної настойки собачої кропиви меншою токсичністю, анксиоселективністю транквілізуючої дії, відсутністю негативного впливу на координацію рухів, когнітивні функції та фізичну витривалість [222].

Фітопрепарати можуть підвищувати безпеку комбінованої фармакотерапії. Так, валепотріати валеріани знижують тривожність тварин в умовах відміни діазепаму (за тестом хрестоподібного піднесеного лабіринту) [223]. Геспередин виявляє синергізм із діазепамом, тому розглядають можливість його використання з метою зменшення дози бензодіазепінів [146]. Тризаміщене похідне бензофлавонону, виділене з *Passiflora incarnata*, попереджує розвиток синдрому відміни бензодіазепінів (за визначенням локомоторної активності мишей, дія є дозозалежною у діапазоні доз (10 – 100) мг/кг) і не спричиняє синдрому відміни [224]. Водно-спиртовий екстракт квіток *Matricaria recutita* L. (25 мг/кг внутрішньоочеревинно у профілактичному режимі) зменшує прояви синдрому відміни морфіну, подібно до дії бензодіазепінів [225].

Проведений аналіз інформаційних джерел дозволяє зробити такі висновки:

Седативний та/або анксиолітичний ефект підтверджено в експерименті та/або клініці у 301 виду лікарських рослин.

Седативний та/або анксиолітичний ефект лікарських рослин обумовлений численними біологічно активними речовинами, найбільша кількість речовин із такою дією серед монотерпенів та їх глікозидів, флавоноїдів та алкалоїдів.

Складна фітохімічна композиція сумарних препаратів лікарських рослин є причиною різноманіття механізмів і можливості синергізму ефектів, що часто є вирішальним для виявлення активності *in vivo*. Особливого значення за таких умов набувають біофармацевтичні чинники.

Лікарські рослини та біологічно активні речовини рослинного походження є суттєвим резервом створення перспективних лікарських засобів седативної й анксиолітичної дії, а також підвищення ефективності та безпечності комбінованої фармакотерапії порушень діяльності ЦНС. Актуальним завданням також є вдосконалення складу наявних седативних/анксиолітичних фітопрепаратів, створення сучасних лікарських форм.

ЛІТЕРАТУРА

1. Delini-Stula A., Holsboer-Trachsler E. Treatment strategies in anxiety disorders – an update / A. Delini-Stula, E. Holsboer-Trachsler // Ther. Umsch. – 2009. – Vol. 66, № 6. – P. 425-431.

2. Nemeroff C.B. Anxiolytics: past, present, and future agents / C.B. Nemeroff // J Clin. Psychiatry. – 2003. – Vol. 64, № 3. – P. 3-6.

3. Ninan P.T. Dissolving the burden of generalized anxiety disorder / P.T. Ninan // Ibid. – 2001. – Vol. 62, № 19. – P. 5-10.

4. Стриженок Е.А. Фармакоэпидемиология лекарственных средств у беременных: Автореф. дис. ... к.мед.н. – Смоленск, 2005. – 26 с.

5. Бородин В.И. Побочные эффекты транквилизаторов и их роль в пограничной психиатрии / В.И. Бородин // Психиатр. и психофармакол. – 2000. – № 3. – С. 72-74.

6. Штрыголь С.Ю. Транквилизаторы (анксиолитики): фармакологические свойства, направления совершенствования, проблемы безопасности применения / С.Ю. Штрыголь, Д.В. Штрыголь, Т.В. Картунова // Провизор. – 2005. – № 20. – С. 14-18.

7. Gilhotra N. A review on antianxiety plants / N. Gilhotra, D. Dhingra // Natural product radiance. – 2008. – Vol. 7, № 5. – P. 476-483.

8. Validation of anticonvulsant and sedative activity of six medicinal plants / E.N. Bum, G.S. Taiwe, L.A. Nkainsa et al. // Epilepsy Behav. – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 454-458.

9. Adeyemi O.O. Sedative and anticonvulsant activities of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome et Labroy (Agavaceae) / O.O. Adeyemi, O.K. Yemitan, O.O. Adebisi // J. Ethnopharmacol. – 2007. – Vol. 113, № 1. – P. 111-114.

10. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / Ред. Г.П. Яковлев, К.Ф. Блинова. – СПб., 1999. – 407 с.

11. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts / A.O. Ayoka, R.O. Akomolafe, E.O. Iwalewa, O.E. Ukponmwan // Afr. J. Trad. CAM. – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 153-165.

12. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice / P. N'Gouemo, B. Koudogbo, H. Pambou Tchivounda et al. // Phytother. Res. – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 243-245.

13. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex / R. Estrada-Reyes, C. López-Rubalcava, L. Rocha et al. // Pharm. Biol. – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 70-75.

14. Фармацевтична енциклопедія / Голова ред. ради та автор передмови В.П. Черних. – 2-ге вид., перероб. і доповн. – К.: Моріон, 2010. – 1632 с.

15. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзинський. – К.: Голов. ред. УРЕ, 1989. – 544 с.

16. Shri R. Bioactivity-directed separation of an anxiolytic fraction from *Aethusa cynapium* L. / R. Shri, M. Singh, A. Sharma // J. Pharmacognosy and Phytotherapy. – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 17-23.

17. WHO monographs on selected medicinal plants. – Vol. 1. – Geneva: World Health Organization, 1999. – 289 p.

18. Therapeutic efficacy of phytochemicals as anti-anxiety-a review / V. Gupta, P. Bansal, S. Kumar et al. // J. Pharmacy Research. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 174-179.

19. Emamghoreishi M. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze / M. Emamghoreishi, M. Khasaki, M.F. Aazam // J. Ethnopharmacol. – 2005. – Vol. 96, № 3. – P. 365-370.

20. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice / O. Grundmann, J. Nakajima, K. Kamata et al. // Phytomedicine. – 2009. – Vol. 16, № 4. – P. 295-302.

21. Adeyemi O.O. Neurosedative and muscle-relaxant activities of ethyl acetate extract of *Baphia nitida* Afzel. / O.O. Adeyemi, O.K. Yemitan, A.E. Taiwo // J. Ethnopharmacol. – 2006. – Vol. 106, № 3. – P. 312-316.

22. Central nervous system activity of *Rhazya stricta* (Decne) in mice / B.H. Ali, A.K. Bashir, N.R. Banna, M.O. Tanira // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 1995. – Vol. 22, № 4. – P. 248-253.

23. Tiwari S. Plants: A Rich Source of Herbal Medicine / S. Tiwari // J. Nat. Prod. — 2008. — Vol. 1. — P. 27-35.
24. Сафонов Н.Н. Полный атлас лекарственных растений / Н.Н. Сафонов. — М.: Изд-во Эксмо, 2005. — 312 с.
25. Стукалова Л.А. Лекарственные растения в психиатрии / Л.А. Стукалова, С.Н. Боков. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. — 88 с.
26. Central inhibitory effects of water extract of *Acori graminei* rhizoma in mice / J.F. Liao, S.Y. Huang, Y.M. Jan et al. // J. Ethnopharmacol. — 1998. — Vol. 61, № 3. — P. 185-193.
27. Анксиолитическая активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов / Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н., Титова И.Н. // Растительные ресурсы. — 2007. — Т. 43, № 3. — С. 130-139.
28. Carr M.N. Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice / M.N. Carr, N. Bekku, H. Yoshimura // Eur. J. Pharmacol. — 2006. — Vol. 531, № 1-3. — P. 160-165.
29. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: comparison of red ginseng and sun ginseng / J.H. Park, H.Y. Cha, J.J. Seo et al. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. — 2005. — Vol. 29, № 6. — P. 895-900.
30. Anxiolytic-like effects of ginsenosides on the elevated plus-maze model in mice / H.Y. Cha, J.H. Park, J.T. Hong et al. // Biol. Pharm. Bull. — 2005. — Vol. 28, № 9. — P. 1621-1625.
31. Hypnotic effects and binding studies for GABAA and 5-HT_{2C} receptors of traditional medicinal plants used in Asia for insomnia / Sueng-Mock Cho, Makoto Shimizu, C. Justin Lee et al. // J. Ethnopharmacol. — 2010. — Vol. 132, № 1. — P. 225-232.
32. Modulation of American ginseng on brainstem GABAergic effects in rats / C.S. Yuan, A.S. Attele, J.A. Wu, D. Liu // Ibid. — 1998. — Vol. 62, № 3. — P. 215-222.
33. Фитоэргономика / Иванченко В.А., Гродзинский А.М., Черевченко Т.М. и др.; Ред. Гродзинский А.М. — Киев: Наук. думка, 1989. — 296 с.
34. Della Loggia R. Evaluation of the activity on the mouse CNS of several plant extracts and a combination of them / R. Della Loggia, A. Tubaro, C. Redaelli // Riv. Neurol. — 1981. — Vol. 51, № 5. — P. 297-310.
35. Biologically active preparations from *Lactuca virosa* L. / D. Gromek, W. Kisiel, A. Klodzińska, E. Chojnacka-Wójcik // Phytotherapy Research. — 1992. — Vol. 6, № 5. — P. 285-287.
36. Spinella M. The psychopharmacology of herbal medicine: plant drugs that alter mind, brain, and behavior / Spinella M. — Cambridge, Massachusetts, London: the MIT Press, 2001. — 578 p.
37. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects / H. Viola, C. Wasowski, M. Levi de Stein et al. // Planta Med. — 1995. — Vol. 61, № 3. — P. 213-216.
38. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice / A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Michalska et al. // J. Ethnopharmacol. — 2006. — Vol. 107, № 2. — P. 254-258.
39. Zhang Z.-J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders / Z.-J. Zhang // Life Sciences. — 2004. — № 75. — P. 1659-1699.
40. Sedative effects of the methanolic leaf extract of *Newbouldia laevis* in mice and rats / S. Amos, L. Binda, H. Vongtau et al. // Boll. Chim. Farm. — 2002. — Vol. 141, № 6. — P. 471-475.
41. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice / M. Rabbani, S.E. Sajjadi, G. Vaseghi, A. Jafarian // Fitoterapia. — 2004. — Vol. 75, № 5. — P. 457-464.
42. Sedative and anticonvulsant effects of an alcoholic extract of *Capparis deciduas* / M. Goyal, B.P. Nagori, D. Sasmal et al. // J. Nat. Med. — 2009. — Vol. 63, № 4. — P. 375-379.
43. Anxiolytic effect of hydroethanolic extract of *Drymaria cordata* L Willd. / C.C. Barua, J.D. Roy, B. Buragohain et al. // Indian J. Exp. Biol. — 2009. — Vol. 47, № 12. — P. 969-973.
44. Yemitan O.K. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum* / O.K. Yemitan, H.M. Salahdeen // Fitoterapia. — 2005. — Vol. 76, № 2. — P. 187-193.
45. Aziba P.I. Antispasmodic, analgesic and sedative effects of mormodica involucreta aqueous extract in rodents / P.I. Aziba, J.F. Sandahl, G. Sibandze // Pharm. Biology. — 2007. — Vol. 45, № 4. — P. 339-341.
46. Pal D. Evaluation of CNS activities of ethanol extract of roots and rhizomes of *Cyperus rotundus* in mice / D. Pal, S. Dutta, A. Sarkar // Acta Poloniae Pharm. Drug Research. — 2009. — Vol. 66, № 5. — P. 535-541.
47. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus* / V.S. Rakotonirina, E.N. Bum, A. Rakotonirina, M. Bopelet // Fitoterapia. — 2001. — Vol. 72, № 1. — P. 22-29.
48. Neuropharmacological screening of *Diospyros mespiliformis* in mice / B. Adzu, S. Amos, I. Muazzam et al. // J. Ethnopharmacol. — 2002. — Vol. 83, № 1-2. — P. 139-143.
49. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense* / J.G. Dos Santos Jr., M.M. Blanco, F.H. Do Monte et al. // Fitoterapia. — 2005. — Vol. 76, № 6. — P. 508-513.
50. Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L.: sedative and anxiolytic properties / M.C. Lanhers, J. Fleurentin, P. Cabalion et al. // J. Ethnopharmacol. — 1990. — Vol. 29, № 2. — P. 189-198.
51. N'gouemo P. Some neuropharmacological effects of an ethanolic extract of *Maprounea africana* in rodents / P. N'gouemo, C. Nguemby-Bina, M. Baldy-Moulinier // Ibid. — 1994. — Vol. 43, № 3. — P. 161-166.
52. Anxiolytic and anticonvulsant effects of dioclenol flavonoid isolated from stem bark of *Dioclea grandiflora* on mice / E.R. De Almeida, H.S. Xavier, T.M. Chaves et al. // Intern. J. of Appl. Res. in Nat. Prod. — 2009-2010. — Vol. 2, № 4. — P. 44-51.
53. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test / I.M. Raupp, A. Sereniki, S. Virtuoso et al. // J. Ethnopharmacol. — 2008. — Vol. 118, № 2. — P. 295-299.
54. Anxiolytic activity of seed extract of *Caesalpinia bonducella* (roxb) in laboratory animals / A. Ali, N. Venkat Rao, M. Shalam et al. [Электронный ресурс] // The Internet Journal of Pharmacology. — 2008. — Vol. 5, № 2. Режим доступа до ресурсу: http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_pharmacology/volume_5_number_2_25/article/anxiolytic_activity_of_seed_extract_of_caesalpinia_bonducella_roxb_in_laboratory_animals.html
55. Kasture V.S. Anxiolytic and anticonvulsive activity of *Sesbania grandiflora* leaves in experimental animals / V.S. Kasture, V.K. Deshmukh, C.T. Chopde // Phytother. Res. — 2002. — Vol. 16, № 5. — P. 455-460.
56. Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress / J. Nirmal, Ch.S. Babu, Th. Harisudhan, M. Ramanathan [Электронный ресурс] // BMC Complementary and Alternative Medicine. — 2008. Режим доступа до ресурсу: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/8/15/abstract>
57. Effects of *Himantalia elongata* on the central nervous system of mice / J.M. Anca, M. Lamela, I. Cadavid, J.M. Calleja // J. Ethnopharmacol. — 1990. — Vol. 29, № 2. — P. 225-231.
58. Differential effects of three species of *Hypericum* in an open field test / G. Diana, A. Capasso, E. Quaranta, V. De Feo // Phytother. Res. — 2007. — Vol. 21, № 3. — P. 215-219.
59. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test / M. Coleta, M.G. Campos, M.D. Cotrim, A. Proença da Cunha // Pharmacopsychiatry. — 2001. — Vol. 34, № 1. — P. 20-21.
60. Beijamini V. Effects of *Hypericum perforatum* and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze / V. Beijamini, R. Andreatini // Pharmacol Res. — 2003. — Vol. 48, № 2. — P. 199-207.

61. Anxiolytic activity of Indian *Hypericum perforatum* Linn: an experimental study / V. Kumar, A.K. Jaiswal, P.N. Singh, S.K. Bhattacharya // *Indian J. Exp. Biol.* — 2000. — Vol. 38, № 1. — P. 36-41.
62. Extract of *Ganoderma lucidum* potentiates pentobarbital-induced sleep via a GABAergic mechanism / Q.P. Chu, L.E. Wang, X.Y. Cui et al. // *Pharmacol Biochem Behav.* — 2007. — Vol. 86, № 4. — P. 693-698.
63. An anxiolytic-like effect of *Ginkgo biloba* extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice / H. Kuribara, S.T. Weintraub, T. Yoshihama, Y. Maruyama // *J. Nat. Prod.* — 2003. — Vol. 66, № 10. — P. 1333-1337.
64. Interactions of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), diazepam and ethyl beta-carboline-3-carboxylate on social behavior of the rat / R. Chermat, D. Brochet, F.V. DeFeudis, K. Drieu // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1997. — Vol. 56, № 2. — P. 333-339.
65. Rabbani M. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice / M. Rabbani, S.E. Sajjadi, A. Mohammadi // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* — 2008. — Vol. 5, № 2. — P. 181-186.
66. Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. on the elevated plus-maze model of anxiety in mice / M. Rabbani, S.E. Sajjadi, A. Jafarian, G. Vaseghi // *J. Ethnopharmacol.* — 2005. — Vol. 101, № 1. — P. 3100-3103.
67. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice / A. Ibarra, N. Feuillere, M. Roller et al. // *Phytomedicine.* — 2010. — Vol. 17. — P. 397-403.
68. Miłkowska-Leyck K. Pharmacological effects of lavender-lifolioside from *Leonurus cardiaca* / K. Miłkowska-Leyck, B. Filipek, H. Strzelecka // *J. Ethnopharmacol.* — 2002. — Vol. 80, № 1. — P. 85-90.
69. Экспериментальное и клиническое изучение влияния препарата иридол на центральную нервную систему / Макаров В.Г., Александрова А.Е., Шиков А.Н. и др. // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2006. — Т. 69, № 3. — С. 23-25.
70. Энциклопедия лекарственных растений. — Испания: Ридерз дайджест, 2004. — 351 с.
71. Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra* / D.A. Daels-Rakotoarison, V. Seidel, B. Gressier et al. // *Arzneimittelforschung.* — 2000. — Vol. 50, № 1. — P. 16-23.
72. Rabbani M. Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour / M. Rabbani, S.E. Sajjadi, A. Jalali // *Phytother. Res.* — 2005. — Vol. 19, № 10. — P. 854-858.
73. Freire C.M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil / C.M. Freire, M.O. Marques, M. Costa // *J. Ethnopharmacol.* — 2006. — Vol. 105, № 1-2. — P. 161-166.
74. Anxiolytic activity of ethanolic extract of leaves of *Ocimum sanctum* in rats / Sudhakar Pemminati, B. Swati, C. Shreyasi, R. Chandrasekhar // *Drug Invention Today.* — 2010. — Vol. 2, № 2. — P. 115-118.
75. Phytochemical and biological analysis of skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties / R. Awad, J.T. Arnason, V. Trudeau et al. // *Phytomedicine.* — 2003. — Vol. 10, № 8. — P. 640-649.
76. Ernst E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials / E. Ernst // *Ibid.* — 2006. — Vol. 13, № 3. — P. 205-208.
77. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans* / M. Herrera-Ruiz, Y. García-Beltrán, S. Mora et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2006. — Vol. 107, № 1. — P. 153-158.
78. The hydroalcoholic extract of *Salvia elegans* induces anxiolytic- and antidepressant-like effects in rats / S. Mora, R. Millán, H. Lungenstrass et al. // *Ibid.* — 2006. — Vol. 106, № 1. — P. 76-81.
79. Pharmacological characterization and mechanisms of the novel antidepressive- and/or anxiolytic-like substances identified from *Perillae Herba* / M. Tsuji, K. Miyagawa, T. Takeuchi, H. Takeda // *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* — 2008. — Vol. 28, № 4. — P. 159-167.
80. Данилов С.А. Пустырник: фитохимические особенности и новые грани фармакологических свойств / С.А. Данилов, С.Ю. Штрыголь, С.И. Степанова // *Провизор.* — 2011. — № 9. — С. 27-30.
81. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice / A.L. Martínez, F. Domínguez, S. Orozco et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2006. — Vol. 106, № 2. — P. 250-255.
82. The anxiolytic effect of two oriental herbal drugs in Japan attributed to honokiol from magnolia bark / H. Kuribara, E. Kishi, N. Hattori et al. // *J. Pharm Pharmacol.* — 2000. — Vol. 52, № 11. — P. 1425-1429.
83. Anxiolytic activity of a supercritical carbon dioxide extract of *Souroubea sympetala* (Marcgraviaceae) / M. Mullally, K. Kramp, C. Cayer et al. // *Phytother. Res.* — 2011. — Vol. 25, № 23. — P. 264-270.
84. Evaluation of the sedative properties of the ethanolic root extract of *Cissampelos mucronata* Boll / P.A. Akah, S.V. Nwafor, C.O. Okoli, C.U. Egbogha // *Chim. Farm.* — 2002. — Vol. 141, № 3. — P. 243-246.
85. Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid from Chinese herb *Radix*, augmented the hypnotic effect of pentobarbital through serotonergic system / X. Zhao, X.Y. Cui, B.Q. Chen et al. // *Eur J Pharmacol.* — 2004. — Vol. 506, № 2. — P. 101-105.
86. Sedative and anticonvulsant activities of methanol extract of *Dorstenia arifolia* in mice / G. Zapata-Sudo, T.C. Mendes, M.A. Kartnaller et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2010. — Vol. 130, № 1. — P. 9-12.
87. Central nervous system activity of the methanol extract of *Ficus platyphylla* stem bark / B.A. Chindo, S. Amos, A.A. Odotola et al. // *Ibid.* — 2003. — Vol. 85, № 1. — P. 131-137.
88. Lu M.C. Studies on the sedative effect of *Cistanche deserticola* / M.C. Lu // *Ibid.* — 1998. — Vol. 59, № 3. — P. 161-165.
89. Neurophysiological effects of an extract of *Eschscholtzia californica* Cham. (*Papaveraceae*) / A. Rolland, J. Fleurentin, M.C. Lanhers et al. // *Phytother. Res.* — 2001. — Vol. 15, № 5. — P. 377-381.
90. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system / O. Grundmann, J. Wang, G.P. McGregor, V. Butterweck // *Planta Med.* — 2008. — Vol. 74, № 15. — P. 1769-1773.
91. Carlini E.A. Plants and the central nervous system / E.A. Carlini // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* — 2003. — Vol. 75. — P. 501-512.
92. Soulmani R. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse / R. Soulmani, C. Younos, S. Jarmouni // *J. Ethnopharmacol.* — 1997. — Vol. 57, № 1. — P. 11-20.
93. Dhawan K. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata* / K. Dhawan, S. Kumar, A. Sharma // *Fitoterapia.* — 2001. — Vol. 72, № 8. — P. 922-926.
94. Штрыголь С.Ю. Седативные средства растительного происхождения: Алора — препарат пассифлоры / С.Ю. Штрыголь, Д.В. Штрыголь // *Провизор.* — 2010. — № 20. — С. 2-5.
95. Possible involvement of GABA A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice / L.F. Lolli, C.M. Sato, C.V. Romanini et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2007. — Vol. 111, № 2. — P. 308-314.
96. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves / R.D. Petry, F. Reginatto, F. de-Paris et al. // *Phytother. Res.* — 2001. — Vol. 15, № 2. — P. 162-164.

97. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids / L.M. Sena, S.M. Zucolotto, F.G. Reginaldo et al. // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). — 2009. — Vol. 234, № 8. — P. 967-975.
98. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models / P.C. de Castro, A. Hoshino, J.C. da Silva, F.R. Mendes // *Phytother. Res.* — 2007. — Vol. 21, № 5. — P. 481-484.
99. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* / J. Deng, Y. Zhou, M. Bai et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2010. — Vol. 128, № 1. — P. 148-153.
100. Biological and electroencephalographic parameters in rats in relation to *Passiflora incarnata* L. / N. Soprani, G. De Feo, G. Mazzanti, L. Tolu // *Clin. Ter.* — 1990. — Vol. 132, № 5. — P. 329-333.
101. Anxiolytic activity of Indian *Abies pindrow* Royle leaves in rodents: an experimental study / V. Kumar, R.K. Singh, A.K. Jaiswal et al. // *Indian J. Exp. Biol.* — 2000. — Vol. 38, № 4. — P. 343-346.
102. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice / M.M. Blanco, C.A. Costa, A.O. Freire et al. // *Phytomedicine.* — 2009. — Vol. 16, № 2-3. — P. 265-270.
103. Sedative activity of some plants used in Mexico to treat insomnia / S.L. Guzman-Gutierrez, J.L. Balderas, A. Aguilar, A. Navarrete // *Rev. Latinoamer. Quím.* — 2009. — Vol. 37, № 3. — P. 243-251.
104. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites / F.S. Duarte, M. Marder, A.A. Hoeller et al. // *Psychopharmacology (Berl.)*. — 2008. — Vol. 197, № 3. — P. 351-360.
105. Anticonvulsant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. / O.O. Adeyemi, A.J. Akindele, O.K. Yemitan et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2010. — Vol. 130, № 2. — P. 191-195.
106. *Nigella sativa* L. seed extract modulates the neurotransmitter amino acids release in cultured neurons in vitro / T. El-Naggar, M.P. Gómez-Serranillos, O.M. Palomino et al. [Электронный ресурс] // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2010. Режим доступа до ресурсу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896676/?tool=pubmed>
107. Han B.H. Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants / B.H. Han, M.H. Park, J.H. Park // *Pure Appl. Chem.* — 1989. — Vol. 61, № 3. — P. 443-448.
108. Effects of hawthorn seed and pulp extracts on the central nervous system // O.D. Can, U.D. Ozkay, N. Oztürk, Y. Oztürk // *Pharm. Biol.* — 2010. — Vol. 48, № 8. — P. 924-931.
109. Involvement of GABA(A)-benzodiazepine receptor in the anxiolytic effect induced by hexanic fraction of *Rubus brasiliensis* / Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice / E. Nogueira, G.J.M. Rosa, M. Haraguchi, V.S. Vassilief // *J. Ethnopharmacol.* — 1998. — Vol. 61, № 2. — P. 111-126.
110. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice / E. Ngo Bum, G.S. Taiwe, F.C. Moto et al. // *Epilepsy Behav.* — 2009. — Vol. 15, № 4. — P. 434-440.
111. Carvalho-Freitas M.I. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. / M.I. Carvalho-Freitas, M. Costa // *Biol Pharm Bull.* — 2002. — Vol. 25, № 12. — P. 1629-1633.
112. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice / M.E. Gonzalez-Trujano, D. Carrera, R. Ventura-Martinez et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2006. — Vol. 106, № 1. — P. 129-135.
113. Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice / S. Mora, G. Diaz-Veliz, H. Lungenstrass et al. // *Ibid.* — 2005. — Vol. 97, № 2. — P. 191-197.
114. Anticonvulsant and sedative effects of *Salvadora persica* L. stem extracts / M.T. Monforte, A. Trovato, A. Rossitto et al. // *Phytother. Res.* — 2002. — Vol. 16, № 4. — P. 395-397.
115. Yemitan O.K. CNS depressant activity of *Lecaniodiscus cupanioides* / O.K. Yemitan, O.O. Adeyemi // *Fitoterapia.* — 2005. — Vol. 76, № 5. — P. 412-418.
116. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus Schisandrae* in mice and rats / F. Huang, Y. Xiong, L. Xu et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 2007. — Vol. 110, № 3. — P. 471-475.
117. Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice / J.L. Balderas, V. Reza, M. Ugalde et al. // *Ibid.* — 2008. — Vol. 119, № 1. — P. 47-52.
118. Isolation of jacaranone, a sedative constituent extracted from the flowers of the Mexican tree *Ternstroemia pringlei* / J. Lozada-Lechuga, M.L. Villarreal, M.A. Fliniaux et al. // *Ibid.* — 2010. — Vol. 127, № 2. — P. 551-554.
119. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. *Mexicana* / E. Aguirre-Hernández, H. Rosas-Acevedo, M. Soto-Hernández et al. // *Planta Med.* — 2007. — Vol. 73, № 11. — P. 1148-1155.
120. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae) / H. Viola, C. Wolfman, M. Levi de Stein et al. // *J. Ethnopharmacol.* — 1994. — Vol. 44, 1. — P. 47-53.
121. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test / M. Herrera-Ruiz, R. Román-Ramos, A. Zamilpam et al. // *Ibid.* — 2008. — Vol. 118, № 2. — P. 312-317.
122. Kumar S. Apigenin — the anxiolytic constituent of *Turnera aphrodisiaca* Ward. / S. Kumar, A. Sharma // *Pharm. Biol.* — 2006. — Vol. 44, № 2. — P. 84-90.
123. *Valeriana officinalis* root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats / K. Murphy, Z.J. Kubin, J.N. Shepherd, R.H. Ettinger // *Phytomedicine.* — 2010. — Vol. 17, № 8-9. — P. 674-678.
124. Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice / I. Oliva, M.E. González-Trujano, J. Arrieta et al. // *Phytother. Res.* — 2004. — Vol. 18, № 4. — P. 290-296.
125. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis* / S. Fernández, C. Wasowski, A.C. Paladini, M. Marder // *Pharmacol Biochem Behav.* — 2004. — Vol. 77, № 2. — P. 399-404.
126. Sakamoto T. Psychotropic effects of Japanese valerian root extract / T. Sakamoto, Y. Mitani, K. Nakajima // *Chem. Pharm. Bull.* — 1992. — Vol. 40, № 3. — P. 758-761.
127. Clinical observation and pharmacological investigation of the sedative and hypnotic effects of the Chinese drug rhizome and root of *Patrinia Scabiosaefolia* Fisch / H.C. Luo, Y.H. Cui, Y.C. Shen, Z.Q.J. Lou // *Tradit. Chin. Med.* — 1986. — Vol. 6, № 2. — P. 89-94.
128. Ethnopharmacology of *Lippia alba* / T. Hennebel, S. Sahpaz, H. Joseph, F. Bailleul // *J. Ethnopharmacol.* — 2008. — Vol. 116, № 2. — P. 211-222.
129. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice / M.C. Hellió-Ibarrola, D.A. Ibarrola, Y. Montalbetti et al. // *Ibid.* — 2006. — Vol. 105, № 3. — P. 400-408.
130. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. / S. Julião Lde, S.G. Leitão, C. Lotti et al. // *Phytochemistry.* — 2010. — Vol. 71, № 2-3. — P. 294-300.
131. Anxiolytic activity of *Vitex negundo* Linn. in experimental models of anxiety in mice / R.S. Adnaik, P.T. Pai, V.D. Sapakal et al. // *Intern. J. of Green Pharmacy.* — 2009. — Vol. 3, № 3. — P. 243-247.
132. Anxiolytic and anticonvulsant effects on mice of flavonoids, linalool, and α -tocopherol presents in the extract of leaves of

- Cissus sicyoides L. (Vitaceae) [Электронный ресурс] / E.R. de Almeida, K.R. Rafael, G.V. Couto, A.B. Ishigami // J. Biomed Biotechnol. — 2009. Режим доступа до ресурсу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2655362>
133. Houghton P.J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian / P.J. Houghton // J. Pharm. Pharmacol. — 1999. — Vol. 51, № 5. — P. 505-512.
134. Extracts of Valeriana officinalis L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties // M. Hattesoehl, B. Feistel, H. Sievers et al. // Phytomedicine. — 2008. — Vol. 15, № 1-2. — P. 2-15.
135. Машковский М.Д. Лекарства XX века / Машковский М.Д. — М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 1998. — 320 с.
136. Anxiolytic-like effect of baicalin and its additivity with other anxiolytics / Z. Xu, F. Wang, S.Y. Tsang et al. // Planta Med. — 2006. — Vol. 72, № 2. — P. 189-192.
137. Galindo L.A. Biological effects of Ocimum gratissimum L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil / L.A. Galindo, M. Pultrini Ade, M. Costa // Nat. Med. — 2010. — Vol. 64, № 4. — P. 436-441.
138. Nielsen M. High affinity of the naturally occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro / M. Nielsen, S. Frokjaer, C. Braestrup // Biochem. Pharmacol. — 1988. — Vol. 37. — P. 3285-3287.
139. Tsang S.Y. Development of effective therapeutics targeting the GABAA receptor: naturally occurring alternatives / S.Y. Tsang, H. Xue // Curr. Pharm. Design. — 2004. — Vol. 10. — P. 1035-1044.
140. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds / A.C. Paladini, M. Marder, H. Viola et al. // J. Pharm. Pharmacol. — 1999. — Vol. 51, № 5. — P. 519-526.
141. GABA(A) receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone / L. Ren, F. Wang, Z. Xu et al. // Biochem Pharmacol. — 2010. — Vol. 79, № 9. — P. 1337-1344.
142. Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands / J.H. Medina, H. Viola, C. Wolfman et al. // Neurochem Res. — 1997. — Vol. 22, № 4. — P. 419-425.
143. Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex / F. Wang, M. Shing, Y. Huen et al. // Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. — 2005. — Vol. 4, № 5. — P. 575-585.
144. Marder M. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure / M. Marder, A.C. Paladini // Curr. Top. Med. Chem. — 2002. — Vol. 2, № 8. — P. 853-867.
145. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam / S.P. Fernandez, C. Wasowski, A.C. Paladini, M. Marder // Eur. J. Pharmacol. — 2005. — Vol. 512, № 2-3. — P. 189-198.
146. The flavone ispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects / D. Kavvadias, P. Sand, K.A. Youdim et al. // Br. J. Pharmacol. — 2004. — Vol. 142, № 5. — P. 811-820.
147. Two flavones from Scutellaria baicalensis Georgi and their binding affinities to the benzodiazepine site of the GABAA receptor complex / H. Wang, K.M. Hui, S. Xu et al. // Pharmacazie. — 2002. — Vol. 57, № 12. — P. 857-858.
148. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from Scutellaria baicalensis Georgi / K.M. Hui, M.S. Huen, H.Y. Wang et al. // Biochemical Pharmacology. — 2002. — Vol. 64, № 9. — P. 1415-1424.
149. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity / M. Coleta, M.G. Campos, M.D. Cotrim et al. // Behav. Brain. Res. — 2008. — Vol. 189, № 1. — P. 75-82.
150. GABA A receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin / F. Wang, Z. Xu, L. Ren et al. // Neuropharmacology. — 2008. — Vol. 55, № 7. — P. 1231-1237.
151. Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester isolated from Salvia guaranitica, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors / M. Marder, H. Viola, C. Wasowski et al. // Phytomedicine — 1996. — Vol. 3. — P. 29-31.
152. 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from Scutellaria baicalensis Georgi, with selective antagonistic properties / M.S. Huen, J.W. Leung, W. Ng et al. // Biochem Pharmacol. — 2003. — Vol. 66, № 1. — P. 125-132.
153. Anticonvulsant effect of wogonin isolated from Scutellaria baicalensis / H.G. Park, S.Y. Yoon, J.Y. Choi et al. // Eur. J. Pharmacol. — 2007. — Vol. 574, № 2-3. — P. 112-119.
154. Ai J. Medicinal plants as a source of novel brain GABAA/benzodiazepine receptor ligands: thesis dissertation Ph.D. / J. Ai. — Roskilde, Denmark, 1999. — 167 p.
155. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors / J.D. Goutman, M.D. Waxenberg, F. Do ate-Oliver et al. // Eur. J. Pharmacol. — 2003. — Vol. 461, № 2-3. — P. 79-87.
156. Benzodiazepine-like compounds and GABA in flower heads of Matricaria chamomilla / R. Avallone, P. Zanolini, L. Corsi et al. // Phytother. Res. — 2000. — Vol. 10. — P. S177-S179.
157. Flavan-3-ol derivatives are positive modulators of GABA(A) receptors with higher efficacy for the alpha(2) subtype and anxiolytic action in mice / S.P. Fernandez, K.N. Mewett, J.R. Hanrahan et al. // Neuropharmacology. — 2008. — Vol. 55, № 5. — P. 900-907.
158. Guzmán-Gutiérrez S.L. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of Citrus sinensis flowers / S.L. Guzmán-Gutiérrez, A. Navarrete // Planta Med. — 2009. — Vol. 75, № 4. — P. 295-301.
159. Central nervous depressant activity of valerianic acid in the mouse / H. Hendriks, R. Bos, H.J. Woerdenbag, A.S. Koster // Ibid. — 1985. — Vol. 51, № 1. — P. 28-31.
160. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, huanarpo (Jatropha cillata) / E. Okuyama, Y. Okamoto, M. Yamazaki, M. Satake // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). — 1996. — Vol. 44, № 2. — P. 333-336.
161. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of Semen Ziziphi spinosae, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT(1A) receptors / L.E. Wang, X.Y. Cui, S.Y. Cui et al. // Phytomedicine. — 2010. — Vol. 17, № 6. — P. 404-449.
162. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of salidroside from the Chinese medicinal plant Rhodiola sachalinensis / T. Li, G. Xu, L. Wu, C. Sun // Ibid. — 2007. — Vol. 14, № 9. — P. 601-604.
163. Central nervous system activity of yangambin from Ocotea duckei Vattimo (Lauraceae) in mice / F.C. de Sousa, B.A. Pereira, V.T. Lima et al. // Phytother Res. — 2005. — Vol. 19, № 4. — P. 282-286.
164. Anxiolytic-like effects of obovatol isolated from Magnolia obovata: involvement of GABA/benzodiazepine receptors complex / J.J. Seo, S.H. Lee, Y.S. Lee et al. // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. — 2007. — Vol. 31, № 7. — P. 1363-1369.
165. Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an oriental herbal medicine / Y. Maruyama, H. Kuribara, M. Morita et al. // Nat. Prod. — 1998. — Vol. 61, № 1. — P. 135-138.
166. Pickens J.T. Sedative activity of cannabis in relation to its delta'-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content / J.T. Pickens // Br. J. Pharmacol. — 1981. — Vol. 72, № 4. — P. 649-656.
167. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb Salvia miltiorrhiza / C.M. Lee, H.N. Wong, K.Y. Chui et al. // Neurosci. Lett. — 1991. — Vol. 127, № 2. — P. 237-241.
168. Elisabetsky E. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex / E. Elisabetsky, J. Marschner, D.O. Souza // Neurochemical Research. — 1995. — Vol. 20, № 4. — P. 461-465.

169. Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male Sprague-Dawley rat / M. Cline, J.E. Taylor, J. Flores et al. // *AANA J.* — 2008. — Vol. 76, №1. — P. 47-52.
170. Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states / K. Kuroda, N. Inoue, Y. Ito et al. // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2005. — Vol. 95, № 2-3. — P. 107-114.
171. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids / A.C. Hall, C.M. Turcotte, B.A. Betts et al. // *Eur. J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 506, № 1. — P. 9-16.
172. Granger R.E. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant alpha1-beta2gamma2L GABA(A) receptors / R.E. Granger, E.L. Campbell, G.A. Johnston // *Biochem Pharmacol.* — 2005. — Vol. 69, № 7. — P. 1101-1111.
173. Herbs, spices and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture and pharmacology. / Ed. by L.E. Craker, J.E. Simon. — Encanto, USA: Oryx Press, 1987. - Vol. 2. — 225 p.
174. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice / M.I. Silva, M.R. de Aquino Neto, P.F. Teixeira Neto et al. // *Pharmacol Biochem Behav.* — 2007. — Vol. 88, № 2. — P. 141-147.
175. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety / S.W. Chen, L. Min, W.J. Li et al. // *Ibid.* — 2004. — Vol. 79, № 2. — P. 377-382.
176. Hänsel R. Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops, II / R. Hänsel, R. Wohlfart, H. Coper // *Z. Naturforsch C.* — 1980. — Vol. 35, № 11-12. — P. 1096-1097.
177. Awad R. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ -aminobutyric acid (GABA) system / R. Awad, D. Levac, P. Cybulska // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 85, № 9. — P. 933-942.
178. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system / B.S. Koo, K.S. Park, J.H. Ha et al. // *Biol. Pharm. Bull.* — 2003. — Vol. 26, № 17. — P. 978-982.
179. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice / W.C. Lim, J.M. Seo, C.I. Lee et al. // *Arch. Pharm. Res.* — 2005. — Vol. 28, № 7. — P. 770-774.
180. Harney J.W. Behavioral and toxicological studies of cyclopentanoid monoterpenes from *Nepeta cataria* / J.W. Harney, I.M. Barofsky, J.D. Leary // *Lloydia.* — 1978. — Vol. 41, № 4. — P. 367-374.
181. Effects of valerian root oil, borneol, isoborneol, bornyl acetate and isobornyl acetate on the motility of laboratory animals (mice) after inhalation / G. Buchbauer, W. Jäger, L. Jirovetz et al. // *Pharmazie.* — 1992. — Vol. 47, № 8. — P. 620-622.
182. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats / C.B. Faturi, J.R. Leite, P.B. Alves et al. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* — 2010. — Vol. 34, № 4. — P. 605-609.
183. Ginkgolides, diterpene trilactones of *Ginkgo biloba*, as antagonists at recombinant alpha1beta2gamma2L GABAA receptors / S.H. Huang, R.K. Duke, M. Chebib et al. // *Eur. J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 494, № 2-3. — P. 131-138.
184. Anxiolytic activity of ginkgolide acid conjugates from Indian *Ginkgo biloba* / K.S. Satyan, A.K. Jaiswal, S. Ghosal, S.K. Bhat-tacharya // *Psychopharmacology (Berl.)* — 1998. — Vol. 136, № 2. — P. 148-152.
185. Tortoriello J. Sedative effect of galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca* / J. Tortoriello, A. Ortega // *Planta Med.* — 1993. — Vol. 59, №5. — P. 398-400.
186. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. / G.F. Araújo, L.M. Carneiro, A.P. Junior et al. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2006. — Vol. 85, № 4. — P. 827-834.
187. Aoyagi N. Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol / N. Aoyagi, R. Kimura, T. Murata // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* — 1974. — Vol. 22, № 5. — P. 1008-1013.
188. Boonen G. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA-A binding site / G. Boonen, H. Häberlein // *Planta Med.* — 1998. — Vol. 64, № 6. — P. 504-506.
189. Jussofie A. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain / A. Jussofie, A. Schmitz, C. Hiemke // *Psychopharmacol. (Berl.)* — 1994. — Vol. 116, № 4. — P. 469-474.
190. Kava extract ingredients, (+)-methysticin and (+/-)-kavain inhibit voltage-operated Na(+) channels in rat CA1 hippocampal neurons / E.I. Magura, M.V. Kopanitsa, J. Gleitz et al. // *Neuroscience.* — 1997. — Vol. 81, № 2. — P. 345-351.
191. Friese J. Kavain, dihydrokavain, and dihydromethysticin non-competitively inhibit the specific binding of [3H]-batrachotoxinin-A 20-alpha-benzoate to receptor site 2 of voltage-gated Na+ channels / J. Friese, J. Gleitz // *Planta Med.* — 1998. — Vol. 64, № 5. — P. 458-459.
192. Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus / J. Walden, J. von Wegerer, U. Winter et al. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* — 1997. — Vol. 21, № 4. — P. 697-706.
193. Interaction of various *Piper methysticum* cultivars with CNS receptors in vitro / L.D. Dinh, U. Simmen, K.B. Bueter et al. // *Planta Med.* — 2001. — Vol. 67, № 4. — P. 306-311.
194. Antithrombotic action of the kava pyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets / J. Gleitz, A. Beile, P. Wilkens et al. // *Ibid.* — 1997. — Vol. 63, № 1. — P. 27-30.
195. Wang S.R. Experimental study on effects of 18 kinds of Chinese herbal medicine for synthesis of thromboxane A2 and PGI2 / S.R. Wang, Z.Q. Guo, J.Z. Liao // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* — 1993. — Vol. 13, № 3. — P. 167-170, 134.
196. Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: interaction with drugs acting at 5-HT receptors / W.H. Peng, C.R. Wu, C.S. Chen et al. // *Life Sci.* — 2004. — Vol. 75, № 20. — P. 2451-2462.
197. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice / F. Cícero Bezerra Felipe, J. Trajano Sousa Filho, L.E. de Oliveira Souza et al. // *Phytomedicine.* — 2007. — Vol. 14, № 9. — P. 605-612.
198. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. — Изд. 16-е, перераб., испр. и доп. / М.Д. Машковский. — М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2010. — 1216 с.
199. Amides from *Piper capense* with CNS activity — a preliminary SAR analysis / M.E. Pedersen, B. Metzler, G.I. Stafford et al. // *Molecules.* — 2009. — № 14. — P. 3833-3843.
200. Chelidonium majus L.: components with in vitro affinity for the GABAA receptor. Positive cooperation of alkaloids / H. Häberlein, K.P. Tschiersch, G. Boonen, K.O. Hiller // *Planta Med.* — 1996. — Vol. 62, № 3. — P. 227-231.
201. Oliver-Bever B. Medicinal plants in tropical West Africa / B. Oliver-Bever. — New York: Cambridge University Press, 1986. — 375 p.
202. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine / L. Costa-Campos, S.C. Dassoler, A.P. Rigo et al. // *Pharm. Biochem. Behavior.* — 2004. — Vol. 77, № 3. — P. 481-489.
203. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice / de C.T. Melo, A.P. Monteiro, C.P. Leite et al. // *Biol. Pharm. Bull.* — 2006. — Vol. 29, № 3. — P. 451-454.
204. Adenosine, the anxiolytic-like principle of the *Arillus* of *Euphoria longana* / E. Okuyama, H. Ebihara, H. Takeuchi, M. Yamazaki // *Planta Med.* — 1999. — Vol. 65, № 2. — P. 115-119.
205. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method / S.-M. Elsas, D.J. Rossi, J. Raber et al. // *Phytomedicine.* — 2010. — Vol. 17. — P. 940-949.

206. The amount of GABA present in aqueous extracts of valerian is sufficient to account for [3H]GABA release in synaptosomes / M.S. Santos, F. Ferreira, C. Faro et al. // *Planta Med.* — 1994. — Vol. 60, № 5. — P. 475-476.
207. Modulation of GABAA receptors by valerian extracts is related to the content of valerianic acid / G. Trauner, S. Khom, I. Baburin et al. // *Ibid.* — 2008. — Vol. 74, № 1. — P. 19-24.
208. Valerianic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands — in vitro and in vivo characterization / S. Khom, B. Strommer, J. Ramharter et al. // *Br. J. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 161, № 1. — P. 65-78.
209. Ortiz J.G. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release / J.G. Ortiz, J. Nieves-Natal, P. Chavez // *Neurochem. Res.* — 1999. — Vol. 24, № 11. — P. 1373-1378.
210. Биологическая активность суммы валепотриатов, выделенных из валерианы чесночнolistной / Дунаев В.В., Тржецинский С.Д., Тишкин В.С. и др. // *Фармакол. и токсикол.* — 1987. — Т. 50, № 6. — С. 33-37.
211. Synaptosomal GABA release as influenced by valerian root extract—involvement of the GABA carrier / M.S. Santos, F. Ferreira, A.P. Cunha et al. // *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* — 1994. — Vol. 327, № 2. — P. 220-231.
212. Valerian extract and valerianic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro / B.M. Dietz, G.B. Mahady, G.F. Pauli, N.R. Farnsworth // *Brain Res. Mol. Brain Res.* — 2005. — Vol. 138, №2. — P 191-197.
213. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: identification of isovaltrate as an inverse agonist at A1 receptors / S.K. Lacher, R. Mayer, K. Sichardt et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 73, №2. — P. 248-258.
214. Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A(1) adenosine receptors / B. Schumacher, S. Scholle, J. Hölzl et al. // *J. Nat. Prod.* — 2002. — Vol. 65, №10. — P. 1479-1485.
215. Abourashed E.A. In vitro binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors / E.A. Abourashed, U. Koetter, A. Brattström // *Phytomedicine.* — 2004. — Vol. 11, № 7-8. — P. 633-638.
216. Torrado J.J. In vitro release of valerianic and hydroxyvalerianic acids from valerian tablets / J.J. Torrado // *Pharmazie.* — 2003. — Vol. 58, № 9. — P. 636-638.
217. Shohet D. Valepotriates and valerianic acids in commercial preparations of valerian available in Australia / D. Shohet, R.B. Wills, D.L. Stuart // *Ibid.* — 2001. — Vol. 56, № 11. — P. 860-863.
218. Pharmacokinetics of valerianic acid after administration of valerian in healthy subjects // G.D. Anderson, G.W. Elmer, E.D. Kantor et al. // *Phytother. Res.* — 2005. — Vol. 19, № 9. — P. 801-803.
219. Кобзар А.Я. Фармакогнозія в медицині / А.Я. Кобзар. — К.: Медицина, 2007. — 544 с.
220. Effect of *Leonurus cardiaca* oil extract in patients with arterial hypertension accompanied by anxiety and sleep disorders / A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, V.G. Makarov et al. // *Phytother. Res.* — 2011. — Vol. 25, № 4. — P. 540-543.
221. Седативна дія та вплив препаратів собачої кропивки на тривожність, пам'ять, депресивну поведінку й фізичну витривалість / С.А. Данилов, С.Ю. Штриголь, Д.І. Дмитрієвський, А.М. Комісаренко // *Актуальні проблеми сучасної медицини: вісник Української медичної стоматологічної академії.* — 2011. — Т. 11, №2 (34). — С. 19-22.
222. Andreatini R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal / R. Andreatini, J.R. Leite // *Eur. J. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 260, № 2-3. — P. 233-235.
223. Dhawan K. Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic / K. Dhawan, S. Dhawan, S. Chhabra // *J. Pharm. Pharm. Sci.* — 2003. — Vol. 6, № 2. — P. 215-222.
224. Kesmati M. Study of benzodiazepine like effects of *Matricaria recutita* on morphine withdrawal syndrome in adult male rats / M. Kesmati, Z.Z. Abbasi, M.H. Fathi // *Pak. J. Med. Sci.* — 2008. — Vol. 24, № 5. — P. 735-739.
225. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* / Ed. Gerhard Vogel. — Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag. — 2071 p.
226. Валериана в фитотерапії / Н.С. Фурса, А.А. Зотов, С.Е. Дмитрук, С.Н. Фурса. — Томск: Изд-во научно-техн. лит-ры, 1998. — 211 с.
227. Бондаренко О.В. Розробка і стандартизація промислових технологій виробництва твердих лікарських форм на основі валеріани лікарської, м'ягяи перцевої і меліси: Автореф. дис. ... к.фарм.н. — Харків, 2008. — 19 с.
228. Зорикова О.Г. Патриния скабиозолистная / О.Г. Зорикова, Э.И. Хасина. — Владивосток: Дальнаука, 2005. — 109 с.
229. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.И. Литвиненко и др. — Томск. — 223 с.
230. Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока / А.И. Шретер. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.

Резюме

Данилов С.А., Товчига О.В., Степанова С.И., Штриголь С.Ю.

Лекарственные растения, обладающие седативной, анксиолитической и сопряженными видами фармакологической активности, их биологически активные вещества и механизмы их действия

Приведен аналитический обзор по лекарственным растениям мировой флоры с верифицированными в эксперименте и/или клинически седативными и смежными психотропными свойствами (прежде всего, анксиолитическими, снотворными). Обобщены сведения о биологически активных веществах (БАВ) этих растений и механизмах их действия на различных уровнях. Освещена значимость синергизма БАВ для проявления вышеуказанных фармакологических свойств фитопрепаратов, а также важность биофармацевтических факторов в фитофармакологии.

Summary

Danilov S.A., Tovchiga O.V., Stepanova S.I., Shtrygol S.Yu.

Medicinal plants with sedative, anxiolytic, and conjugated forms of pharmacological effects, their biologically active constituents and mechanisms of action

An analytical survey of medicinal plants of the World's flora which showed proved in the experiment and/or clinical sedative and relative psychotropic effects (primarily anxiolytic, hypnotics) was given. Data on biologically active substances (BASs) of these plants and the mechanisms of their action at different levels were summarized. The importance of synergies of BASs for the manifestation of the above-mentioned pharmacological effects of herbal drug preparations, as well as the importance of biopharmaceutical factors in phytopharmacology, was shown.

Данилов Сергій Анатолійович. Заступник директора Департаменту регуляторної політики у сфері обігу лікарських засобів та продукції у системі охорони здоров'я МОЗ України. Здобувач при НФаУ.

Товчига Ольга Володимирівна. Асистент кафедри технології ліків та клінічної фармакології з фарма-

цевтичною опікою інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ. К.фарм.н. (2009).

Степанова Світлана Іванівна. Доцент кафедри хімії природних сполук НФаУ. К.фарм.н. (1995).

Штриголь Сергій Юрійович. Д.мед.н. (2000). Професор (2000). Зав. кафедри фармакології НФаУ.

Аналітичне обладнання для фармацевтичної галузі

Приборы для ВЭТСХ, используемые при контроле очистки технологического оборудования

В процессе производства фармацевтических препаратов не менее важной, чем само изготовление, является очистка производственного оборудования на всех стадиях. процесса производства: это емкости для смешивания, реакторы, буферные емкости, трубопроводы и фасовочные линии. Все поверхности, с которыми соприкасается продукт или полупродукт должны быть отмыты по окончании производства партии и при переходе на изготовление другого продукта.

Как любой процесс производства, в соответствии с требованиями GMP стадия очистки подлежит валидации. Перед запуском новой партии необходимо удостовериться, что на поверхности не осталось следов веществ, использованных в предыдущем процессе. Особенно это критично для активных субстанций сильнодействующих веществ, таких как гормоны, антибиотики и др. Для оптимизации производства стадию очистки всегда стараются свести к минимуму, так как это фактически простой оборудования и, как следствие, уменьшение производительности. С другой стороны, тщательная очистка убирает один из факторов риска, приводящий к производству брака, - наличие примесей. Валидация, как составляющая часть процесса очистки производственного оборудования, состоит из сбора смывов с поверхностей и проведения их анализов. Чем больше точек взятия смывов, тем полнее валидация очистки, но тем большее время будет занимать анализ, то есть увеличивается время простоя оборудования. Уменьшение количества точек контроля может привести к тому, что какие-то из критических точек будут не проверены, а это, в свою очередь, может привести к перекрестному загрязнению продукта. Единственный способ, не уменьшая количество проб, ускорить процесс получения результата очистки — ускорение времени анализа или/и проведение анализа всех проб одновременно. При использовании ВЭЖХ, как метода количественного определения активных компонентов, все пробы анализируются последовательно. При этом, в зависимости от сложности процесса производства, количество проб может достигать до нескольких десятков. Современные системы ВЭЖХ достаточно быстрые, но все-таки требуют подготовки каждой пробы. Следует помнить, что, прежде



чем ввести пробу в систему ВЭЖХ, ее нужно подготовить: экстрагировать, сконцентрировать, отфильтровать. Зачастую пробоподготовка проводится дольше, чем сам анализ. Для сокращения времени анализа стараются заменить ВЭЖХ на спектрометрию в УФ-области, объединять пробы в одну и считать валидацию проведенной, если общее количество активных веществ во всех смывах одновременно не превышает заданной нормы. Эти компромиссные приемы не всегда приемлемы.

Альтернативным способом проведения анализа смывов является тонкослойная хроматография, а точнее - высокоэффективная ТСХ (ВЭТСХ), или как ее еще называют инструментальная тонкослойная хроматография. Современные технические решения для ВЭТСХ ставят этот метод в один ряд с ВЭЖХ. В отличие от привычной нам «классической» ТСХ, ВЭТСХ

использует высокоэффективные пластинки, размер зерна сорбента которых составляет (7-15) мкм, т.е. близок к (5-10) мкм, используемым в ВЭЖХ. Стационарная фаза современных ВЭТСХ-пластинок может быть изготовлена из высокоочищенного силикагеля или из силикагеля с привитыми С18, С8, аминными и диольными группами. Кроме того, сорбент пластинок ВЭТСХ может быть сразу покрыт реагентом, например кофеином. Оборудование для ВЭТСХ также не уступает по своим техническим характеристикам оборудованию ВЭЖХ. Для нанесения пробы на пластинку используется или автоматический аппликатор, или полностью автоматический самплер, дозирование в которых происходит с помощью шприцов производства Hamilton. Объемы шприцов такие же, как и для ВЭЖХ: 100 мкл, 300 мкл, 500 мкл, то есть обеспечивается такая же воспроизводимость, что и при вводе пробы при использовании метода «частичного заполнения петли» в автосамплерах ВЭЖХ — мало кто пользуется ручным методом полного заполнения петли.

В большинстве случаев в ВЭЖХ используется сканирующий спектрофотометрический детектор в УФ и видимой областях. Он позволяет решать большинство задач. Реже вместо сканирующего используют диодноматричный детектор, но он, удорожая систему, позволяет снимать спектры веществ; также методом сравнения спектров одного пика можно определить его чистоту. Вторым по частоте использования есть флуоресцентный детектор. Его используют, если для флуоресцирующего вещества нужно улучшить порог определения. Он значительно удорожает систему. Иногда, чтобы увеличить чувствительность, прибегают к использованию предколоночной или постколоночной дериватизации. Другие детекторы используются в менее чем 5 % всех случаев и применяются, если ни один из вышеперечисленных методов не дает результат.

Что же предлагает инструментальная тонкослойная хроматография? Возможно применение двух типов детекции - видеоденситометрии и сканирующей денситометрии. Видеоденситометрия позволят детектировать как поглощение при длине волны 254 нм, так и флуоресценцию при длине волны возбуждения 365 нм, а также вещества и/или их производные в видимой области. Это распространенный и в то же время дешевый способ детектирования в ТСХ и ВЭТСХ.

Но по-настоящему мощным прибором является ТСХ-сканер. Он позволяет сканировать пластинку монохромным светом в диапазоне

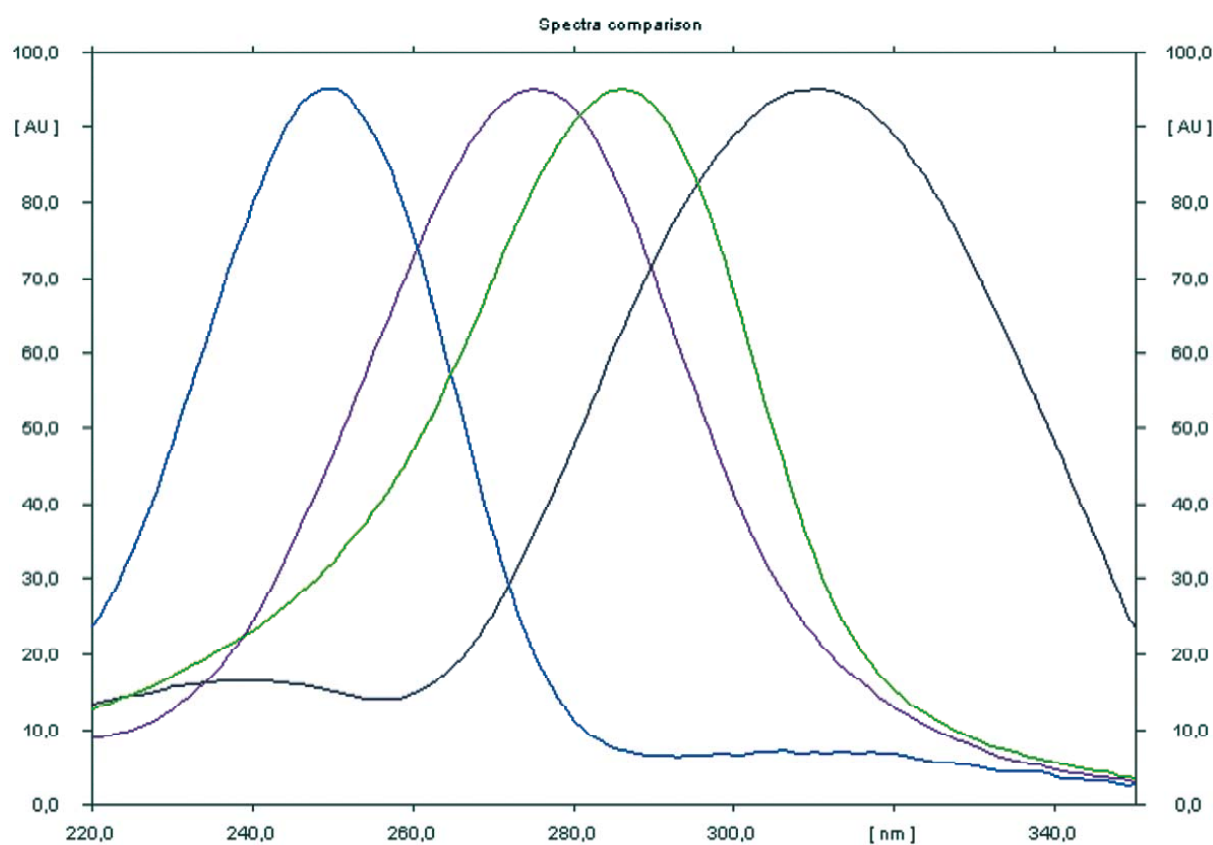
(190 - 900) нм, при этом варьировать ширину щели как монохроматора, так и облучателя. Отсутствие движения потока растворителя дает возможность как измерять спектр любого вещества для идентификации, так и определять чистоту пика. Таким образом, ТСХ-сканер дает такие же возможности, как и диодноматричный детектор ВЭЖХ. Кроме того, ТСХ-сканер может работать и в режиме флуоресценции, то есть заменяет сразу два детектора ВЭЖХ: УФ-ВИД диодноматричный и флуоресцентный.

Стадии элюирования в ВЭЖХ и ВЭТСХ значительно отличаются между собой, поэтому параллели провести сложно. Тем не менее, стадия элюирования в ВЭТСХ происходит полностью автоматически, при этом кроме мониторинга перемещения фронта контролируется насыщение парами растворителя и влажность, как основные критерии хроматографирования. Аналогично ВЭЖХ, возможно проведение градиентного элюирования. Таким образом, ВЭТСХ может полностью заменить ВЭЖХ для анализа смывов при валидации очистки.

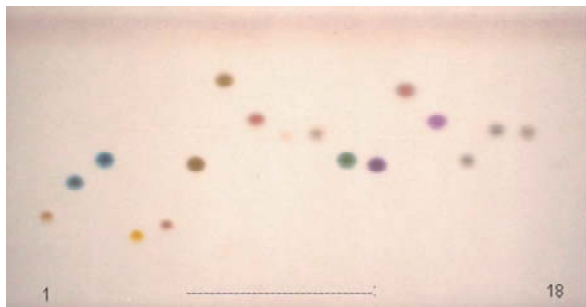
Но где же преимущества? Во-первых, ВЭТСХ остается открытой системой, поэтому пользователь может видеть все, что остается на старте. Во-вторых, на одну пластинку ВЭТСХ размером (20×10) см можно нанести до 72 растворов, то есть не менее 70 проб, и элюировать их одновременно. Таким образом, за 1 час можно провести анализ 70 аналитических проб, что не под силу даже самым быстрым ВЭЖХ-системам. В-третьих, пластинка ВЭТСХ используется один раз, а значит и не существует риска «убить» пластинку, как это часто может быть с колонкой. Указанные выше факты доказывают, что ВЭТСХ не только не уступает ВЭЖХ, но и имеет неоспоримые преимущества для анализа большого количества аналогичных проб.

Рассмотрим использование ВЭТСХ для валидации очистки на примере компании Bayer Weimar GmbH & Co. KG, которая производит заменители гормонов и активные вещества противозачаточного действия для компании Bayer AG. Компания применяет ВЭТСХ для контроля критических точек в производстве. Для валидации очистки ВЭТСХ применяется с 1998 года. Аргументами для принятия решения в пользу ВЭТСХ стали:

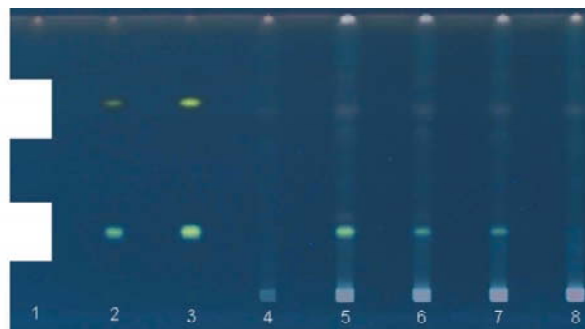
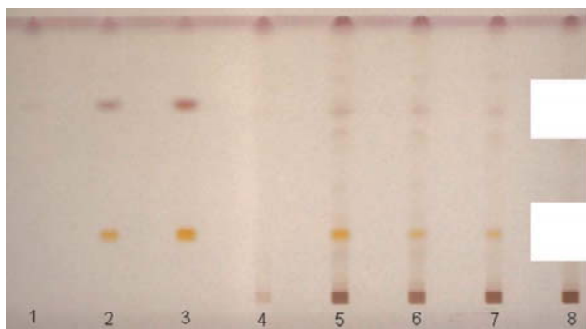
- сопоставимые результаты между ВЭТСХ и ВЭЖХ;
- обработка пластинок с помощью сканера и дериватизации;
- низкий предел обнаружения следовых компонентов;



Спектры поглощения активных ингредиентов (Bayer Weimar)



ВЭТСХ-пластинка после дериватизации в видимом свете и в УФ-свете (366 нм) при проверке селективности



ВЭТСХ-пластинка после дериватизации

дорожки 1-3 — смеси ингредиентов 1 и 2 для калибровки,
 дорожка 4 — холостой раствор,
 дорожки 5-8 — образцы, взятые из 4-х точек оборудования.



Камера для Автоматического элюирования CAMAG (Automatic Developing Chamber (ADC 2)) позволяет автоматически элюировать ВЭТСХ-пластины размером (20 × 10) см, гарантируя высокую воспроизводимость и независимость от влияний условий окружающей среды. Программно устанавливается и контролируется предварительное кондиционирование сорбента, относительная влажность и насыщение камеры, а также движение фронта и сушка по достижении заданной границы фронта элюента. Возможно 2 режима управления: управление и программирование с клавиатуры встроенного контроллера или управление с ПК с помощью программного обеспечения winCATS—операционной системы для ВЭТСХ-анализа.

Если образец наносится не в виде полосы, а в виде прямоугольника, с помощью ADC 2 можно легко и воспроизводимо провести фокусировку места аппликации в тонкую линию перед началом элюирования.

Более подробную информацию можно найти в брошюре «Automatic Developing Chamber ADC 2» или на сайте www.camag.com/adc2.

- анализ большого количества образцов;
- значительная экономия времени и средств.

Для валидации очистки проводится смыв с поверхностей оборудования, согласно оговоренной регламентом процедуре в определенных точках, обычно на площади 200 см². Для этого используются предварительно очищенные в экстракторе Соклета кусочки ткани размером (2-3) см.

Подготовка пробы

Проба трижды экстрагируется 50 мл хлороформа спектроскопической чистоты с применением УЗ-бани. Объединенный экстракт выпаривается до сухого остатка на ротационном испарителе при температуре 60 °С. Остаток смывается хлороформом и на несколько минут помещается в УЗ-баню. Если раствор не прозрачный, его фильтруют или центрифугируют. Аналогично готовят холостой раствор.

Стандарты

Для калибровки готовят стандартные растворы в трех концентрациях в пределах границы определения и 20-ти кратное разведение.

Пластинки ВЭТСХ

Для анализа использовались пластинки Merck ВЭТСХ Силикагель 60 F254, размером (20×10) см.

Нанесение образцов

Нанесение образцов проводилось с помощью автоматического аппликатора Automatic TLC Sampler (ATS4). В данном случае наносили по 100 мкл образца, холостого раствора и стандартных растворов 3-х концентраций в виде прямоугольников размером (4 × 3) мм. Скорость нанесения - 250 нл/с.

Элюирование

Элюирование пластинки проводили с помощью смеси толуол — этилацетат (3:2) в автоматической камере для элюирования (Automatic Developing Chamber (ADC)) после насыщения камеры с пластинкой парами растворителя в течение 10 мин.

Денситометрия

Сканирование проводилось с помощью денситометра TLC Scanner 3 с программным обеспечением winCATS. Идентификация веществ осуществлялась снятием спектра в диапазоне (200-350) нм, количественное определение проводилось по расчету 3-х уровней калибровки.

Постколоночная дериватизация

Для визуализации пятен на пластинке ее подвергают опрыскиванию или погружению в проявитель, состоящий из смеси метанол — серная кислота (9:1). После нанесения раствора пластинку выдерживают при температуре 105 °С в течение 5 мин. Для последующего количественного определения рекомендуется применять погружение, а не опрыскивание, так как при этом фон получается более однородным.

Результаты и их обсуждение

Были получены достоверные результаты при выполнении процедуры валидации с помощью анализа на ВЭТСХ. Значения R_f и спектры поглощения в УФ-области, а также окраска веществ/флуоресценция после дериватизации являются достаточными для идентификации веществ. Проверка чувствительности и селективности показывает, что активные ингредиенты, а также вспомогательные вещества достаточно хорошо разделены. В зависимости от концентраций зависимость концентрация/сигнал может иметь вид как линейный, так и полинома. Приемлемой является функция с коэффициентом корреляции не менее 0.990. При анализе рисков были выявлены точки, требующие повторной очистки и проверки. Посредством калибровки и экстраполяции на всю площадь сосуда, которая соприкасается с

продуктом, было определено, что остаточное количество продукта составляло не более 0.5% от допустимого.

Выводы

Валидация очистки с применением ВЭТСХ-анализа (т.е. определение следовых количеств активных ингредиентов) может быть проведена с требуемой точностью. Метод прост и быстр. Результаты, полученные при использовании количественной денситометрии, точны и достоверны.

Пашко В.В.

Директор «DONAU LAB KIEV»

За более детальной информацией Вы можете обратиться к ответственному лицу Ms Dipl.-Chem. Birgit Boeckel, Bayer Weimar GmbH & Co. KG, Product Supply Pharma, QC Raw Materials, Doebereiner Str. 20, 99427 Weimar, birgit.boeckel@bayer.com

С разрешения компании CAMAG (Switzerland) использована информация из журнала CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE

*Компания «Донау Лаб» — эксклюзивный представитель CAMAG в Украине
Тел.: + 38 (044) 229 1531/ -32, - 33
факс: + 38 (044) 229 1530
office-ua@donaulab.com
www.donaulab.com*

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, встановлених ВАК України.
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 побудований до MS Word (Microsoft Equation 3.0.).
11. Вимоги до ілюстративного матеріалу:
 - ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті та мають бути підписаними;
 - графіки, діаграми та ін. краще будувати у табличному редакторі Excel 97. Якщо даний ілюстративний матеріал створений за допомогою інших програм, зображення слід подавати у векторному форматі WMF. Так як журнал видається у чорно-білому виконанні, графіки мають бути виконані з відповідними відтінками;
 - на графіках мають бути зазначені експериментальні точки;
 - фотографії, файли із растровими зображеннями мають бути високої якості та не мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар та ін.). Формати файлів TIFF, BMP;
 - криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки;
 - структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані у спеціалізованих програмах типу ChemWin та надані у векторному форматі WMF;
 - різні види ілюстративного матеріалу не мають дублювати один одного.
12. Редакція залишає за собою право редагувати статті.
13. Матеріали статті автору не повертаються.
14. При невиконанні зазначених вимог статті розглядатися не будуть.
15. За достовірність інформації у публікаціях відповідальність несуть автори.