

# ГОЛОВНА ПОДІЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ



**PHARM  
P R O M**

Міжнародна спеціалізована виставка-конференція комплексного забезпечення фармацевтичної промисловості

**15 - 17 жовтня 2013 року**



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

**За підтримки:**

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

- Національної академії медичних наук України
- Національного фармацевтичного університету

**Організатори:**



**Партнери:**



- Міжнародна участь і відвідування
- Повний спектр обладнання, меблів, витратних матеріалів, комплексних рішень та послуг для фармацевтичної промисловості
- Нові торгові марки
- Інновації та технології
- Майстер-класи на діючому обладнанні
- Програма BusinessPoint

### ДО УВАГИ СПЕЦІАЛІСТІВ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

- IV Міжнародна конференція для спеціалістів фармацевтичної індустрії України «Дні фармацевтичної промисловості. Інноваційні рішення для виробництва та забезпечення якості лікарських засобів»
- Demo-Tour «Сучасне обладнання та прилади для фармацевтичного виробництва»

### ОДНОЧАСНО З ВИСТАВКОЮ ВІДБУДУТЬСЯ



VI Міжнародний форум  
«Комплексне забезпечення лабораторій»  
та



Міжнародна спеціалізована виставка  
CleanTechExpo – технології чистих приміщень

З питань участі у виставці:

З питань участі в діловій програмі:

+38 044 526 92 97

+38 044 526 90 10

@ pharm@lmt.kiev.ua  
marketing@lmt.kiev.ua

**WWW.PHARMCOMPLEX.COM**



## Зміст

До 80-річчя від дня народження Литвиненка В.І. ....	7
До 75-річчя від дня народження Мазура І.А. ....	9
<b><u>До запровадження Державної Фармакопеї України</u></b>	
<i>Товмасян Є.К.</i>	
Використання ферментів у фармакопейному тесті «Розчинення» для твердих дозованих форм .....	11
<i>Котова Е.Е., Котов А.Г., Вовк О.Г.</i>	
Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Буркун» .....	18
<b><u>Фітохімічні дослідження</u></b>	
<i>Маційчук О.П.</i>	
Кількісне визначення полісахаридів листя, насіння, квіток і коренів подорожника великого та подорожника ланцетолистого .....	30
<i>Єренко О.К., Мазулін О.В., Буряк В.П., Мазулін Г.В.</i>	
Амінокислотний склад трави та ліофільного екстракту <i>Inula helenium</i> L. ....	33
<i>Сигора Н.В.</i>	
Хромато-мас-спектрометричне дослідження летких сполук квіток глодів представників секції <i>Oxyacantae</i> Loud. ....	37
<b><u>Одержання лікарських і допоміжних речовин</u></b>	
<i>Георгієвський Г.В., Мазур І.А.</i>	
Обґрунтування напрямку синтезу та доведення хімічної будови 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду .....	41
<b><u>Готові лікарські засоби</u></b>	
<i>Зінченко О.А., Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г., Коваленко С.М.</i>	
Медико-біологічні показники очних крапель: забезпечення осмолярності при фармацевтичній розробці препаратів .....	47
<b><u>Стандартизація лікарських засобів</u></b>	
<i>Зінченко О.А., Боброва М.Є.</i>	
Визначення сквалену в рослинних оліях методом високоєфективної рідинної хроматографії.....	54
<b><u>Екстемпоральні лікарські засоби</u></b>	
<i>Євтіфєєва О.А.</i>	
Валідація методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного виготовлення.....	61
<b><u>Рослинні препарати та їх фармакологічна дія</u></b>	
<i>Луцак І.В., Штриголь С.Ю., Король А.П.</i>	
Морфологічна характеристика адаптогенного ефекту екстракту родіоли рідкого та екстракту кори осики на моделі іммобілізаційного стресу.....	68

- Рецензенти: чл.-кор. НАНУ, д.фарм.н., професор Георгієвський В.П.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; к.фарм.н. Зінченко О.А.; к.фарм.н. Котов А.Г.; к.х.н. Куліков А.Ю.; д.б.н., професор Маслова Н.Ф.; к.б.н. Нікітіна Н.С.; д.фарм.н. Півень О.П.; к.мед.н. Чайка Л.О.
- Випуск підготували: Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Вовк О.Г., Тихоненко Н.І.
- Рекомендовано до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 8 від 5.12.2012
- Підписано до друку 24.12.12. Тираж 500 прим.

Шульга Л.І.

Антиоксидантний профіль нового рослинного засобу –  
дослідження на модельних системах *in vitro* ..... 77

#### **Фармакологічні дослідження**

Цубанова Н.А.

Дослідження впливу спіроциклічного похідного оксіндолу  
на показники енергетичного обміну при експериментальній церебральній ішемії ..... 81

Надеждін С.В., Турьев Г.В., Кірсанова П.О.,  
Колесніков Д.О., Любушкін Р.О., Даньшина О.П.

Доклінічне дослідження кераміки із цирконію діоксиду  
на цитотоксичність і біосумісність ..... 84

#### **Організація діяльності фармацевтичних підприємств**

Євтушенко О.М., Мнушко З.М.

Складові управління ризиками у сучасній фармації ..... 88

#### **Фармако-економічні та маркетингові дослідження**

Ткаченко Н.О., Книш Є.Г., Червоненко Н.М.

Вивчення інформованості фахівців фармації  
з питань соціально-етичного маркетингу ..... 92

---

## Содержание

К 80-летию со дня рождения Литвиненко В.И. ....	7
К 75-летию со дня рождения Мазура И.А.....	9
<b><u>К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины</u></b>	
<i>Товмасын Е.К.</i>	
Использование ферментов в фармакопейном тесте «Растворение» для твердых дозированных форм.....	11
<i>Котова Э.Э., Котов А.Г., Вовк А.Г.</i>	
Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Донник» .....	18
<b><u>Фитохимические исследования</u></b>	
<i>Маційчук А.П.</i>	
Количественное определение полисахаридов листьев, цветков, семян и корней подорожника большого и подорожника ланцетолистного .....	30
<i>Еренко Е.К., Мазулин А.В., Буряк В.П., Мазулин Г.В.</i>	
Аминокислотный состав травы и лиофильного экстракта <i>Inula helenium</i> L.....	33
<i>Сигора Н.В.</i>	
Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих соединений цветков боярышников представителей секции <i>Oxyacantae</i> Loud.....	37
<b><u>Получение лекарственных и вспомогательных веществ</u></b>	
<i>Георгиевский Г.В., Мазур И.А.</i>	
Обоснование направления синтеза и доказательство химического строения 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромиды .....	41
<b><u>Готовые лекарственные средства</u></b>	
<i>Зинченко А.А., Андриюкова Л.Н., Фетисова Е.Г., Коваленко С.Н.</i>	
Медико-биологические показатели глазных капель: обеспечение осмолярности при фармацевтической разработке препаратов .....	47
<b><u>Стандартизация лекарственных средств</u></b>	
<i>Зинченко А.А., Боброва М.Е.</i>	
Определение сквалена в растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	54
<b><u>Экстемпоральные лекарственные средства</u></b>	
<i>Евтифеева О.А.</i>	
Валидация методик рефрактометрического количественного определения для серии концентрированных растворов аптечного приготовления .....	61
<b><u>Растительные препараты и их фармакологическое действие</u></b>	
<i>Луцак И.В., Штрыголь С.Ю., Король А.П.</i>	
Морфологическая характеристика адаптогенного эффекта экстракта родиолы жидкого и экстракта коры осины на модели иммобилизационного стресса .....	68
<i>Шульга Л.И.</i>	
Антиоксидантный профиль нового растительного средства — исследования на модельных системах <i>in vitro</i> .....	77

**Фармакологические исследования***Цубанова Н.А.*

Изучение влияния спироциклического производного оксиндола на показатели энергетического обмена при экспериментальной церебральной ишемии ..... 81

*Надеждин С.В., Турьев Г.В., Кирсанова П.О., Колесников Д.А., Любушкин Р.А., Даньшина Е.П.*

Доклиническое исследование керамики из циркония диоксида на цитотоксичность и биосовместимость ..... 84

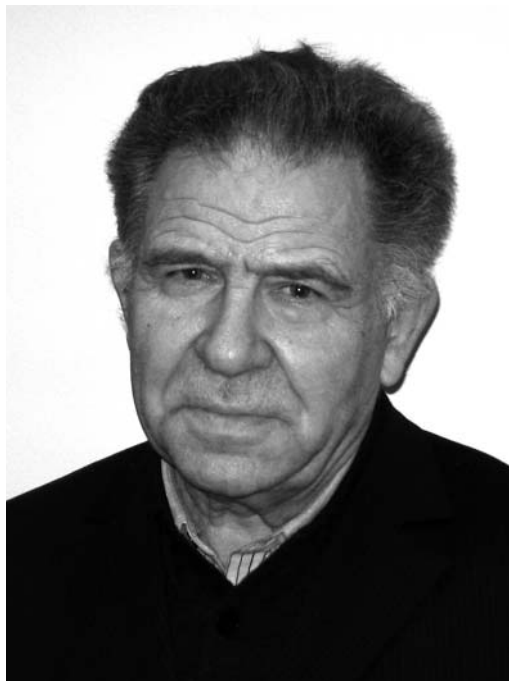
**Организация деятельности фармацевтических предприятий***Евтушенко Е.Н., Мнушко З.Н.*

Составляющие управления рисками в современной фармации ..... 88

**Фармако-экономические и маркетинговые исследования***Ткаченко Н.А., Кныш Е.Г., Червоненко Н.М.*

Изучение информированности специалистов фармации по вопросам социально-этического маркетинга ..... 92

## К 80-летию со дня рождения Литвиненко Василия Ивановича



5 декабря 2012 года исполнилось 80 лет известному ученому и организатору в области фармации, доктору химических наук, профессору, академику Инженерной академии Украины, именованному стипендиату степени имени Николая Авксентиевича Валяшко (присуждается Харьковской областной государственной администрацией) — Литвиненко Василию Ивановичу.

Литвиненко В.И. в 1959 году окончил Харьковский фармацевтический институт, с 1958 года работает в ГП «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции», г. Харьков (ХНИХФИ, ВНИИХТЛС, ГП «ГНЦЛС»).

За время работы в ГНЦЛС прошел путь от аппаратчика, химика, младшего научного сотрудника, старшего научного сотрудника до заведующего лабораторией химии и технологии фенольных препаратов, главного научного сотрудника.

В 1964 году В.И. Литвиненко защитил кандидатскую, в 1990 году - докторскую диссертацию. В 1991 году ему присвоено звание профессора, в 2000 году он избран академиком Инженерной академии Украины.

Многогранная научная деятельность Василия Ивановича нашла отражение в 768 научных публикациях, 79 охранных документах (авторских свидетельствах и патентах, один из

последних — патент Украины на полезную модель №60083 «Способ получения лютеолина», 2011 год), 16 монографиях и около 250 аналитических нормативных документах на лекарственные средства (ВФС, ФС), разработанных при его участии.

Литвиненко Василий Иванович - фитохимик, один из виднейших исследователей биологически активных веществ из растений, ученик Н.П. Максютинной и Д.Г. Колесникова. В 1993- 1994 г.г. являлся членом Экспертного совета медико-биологических и фармацевтических наук ВАК Украины. Василий Иванович - член редакционных советов и редакционных коллегий журналов: «Фармацевтический журнал» (г. Киев), «Ліки» (г. Киев), «Фармаком» (г. Харьков), «Вестник Инженерной академии Украины» (г. Киев), «Фітотерапія в Україні» (г. Киев), участвовал в организации и проведении шести Всесоюзных симпозиумов по фенольным соединениям, четырех Всесоюзных симпозиумов по изучению и использованию солодки в народном хозяйстве СССР. В 1973-1983 г.г. совместно с директором Украинской зональной опытной станции лекарственных растений ВИЛР Д.А. Пакальном участвовал в экспедициях по Крыму и Кавказу по выявлению и заготовке сырья и посадочного материала видов шлемника.

Под руководством В.И. Литвиненко защищено 38 кандидатских и 13 докторских диссертаций.

С участием В.И. Литвиненко разработан и внедрен в промышленное производство целый ряд лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья: из корней солодки — густой и сухой экстракты, глицирам, ликвиристон, ликуразид, флакарбин, лавалон; из цветков бессмертника песчаного - фламин и сухой экстракт; из листьев подорожника - плантаглюцид; из корней шлемника байкальского - жидкий и сухой экстракты, байкалин, производные байкалина с аминокислотами и алкалоидами (совместно с лабораторией физической химии ГНЦЛС) и др. В качестве стандартов предложены кверцетин, рутин, изосалипурпозид, байкалин, скутелларин и капсаицин.

Как значительные вехи в научной деятельности В.И. Литвиненко следует отметить теоретические и экспериментальные исследования по получению полиамидного сорбента и его применению для разделения близких по структу-

ре полифенольных веществ. Также важны его исследования в области УФ-спектроскопии для установления строения флавоноидов с применением ионизирующих и комплексообразующих реагентов.

Работы В.И. Литвиненко по совершенствованию процессов и аппаратов в фитохимическом производстве позволили модернизировать ряд специализированных экстракционных аппаратов, испарителей, измельчителей и сушильных устройств, что позволило интенсифицировать и расширить производство, а также снизить себестоимость растительных препаратов.

*Сотрудники ГП ГНЦЛС, ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» и редакция журнала «Фармаком» искренне желают уважаемому Василию Ивановичу крепкого здоровья, счастья, научных достижений и внедрений новых фитохимических препаратов в медицинскую практику.*

Совместно с сотрудниками лаборатории разработаны фильтрационный и суспензионный способы экстракции и аппаратурное оформление к ним. Эти способы и оборудование апробированы с положительными результатами на ООО «ФК «Здоровье», ООО «Опытный завод ГНЦЛС», ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», ОАО «Лубныфарм».

В.И. Литвиненко в деловых ситуациях компетентный, энергичный, настойчивый научный сотрудник, в отношениях с коллегами - доброжелательный собеседник, что вызывает уважение и создает ему заслуженный авторитет у специалистов и ученых Украины и стран СНГ.



## До 75-річчя від дня народження Мазура Івана Антоновича



Мазур Іван Антонович народився 20 січня 1938 року в селі Гвардійське Хмельницької області.

У 1955 році вступив до Одеського фармацевтичного інституту на фармацевтичний факультет, спеціальність — провізор.

Мазур Іван Антонович - доктор фармацевтичних наук, кандидат хімічних наук, професор, академік Академії технологічної кібернетики України. Автор близько 800 наукових робіт, у тому числі більше ніж 240 патентів, 5 монографій.

Відмінник охорони здоров'я (1982), Заслужений діяч науки і техніки України (2004), Винахідник СРСР (1978), нагороджений Медаллю за розвиток Запорізького краю (2009).

Місце роботи: Запорізький державний медичний університет — професор кафедри фармацевтичної хімії; Товариство з обмеженою відповідальністю «Науково-виробниче об'єднання «Фарматрон» - Президент. Напрямок діяльності є пошук нових біологічно активних речовин і створення на їх основі лікарських препаратів.

Професор І.А. Мазур — один із найвідоміших в Україні спеціалістів у галузі фармацевтичної науки та практики. Під його керівництвом синтезовано понад 2000 сполук гетероциклічного ряду, розроблено способи синтезу препаратів більше ніж для 20 класів сполук, ним відкрито ряд аномальних реакцій. Серед великої кількості синтезованих біологічно активних сполук у ві-

сімдесятих роках ХХ століття його наукова інтуїція та прозорливість дозволили вибрати речовину Е-8252 (у подальшому — тіотриазолін). В 1991 році він ініціював створення науково-виробничого об'єднання «Фарматрон», завершив доклінічні дослідження тіотриазоліну та керував розробкою АНД (ТФС, регламенти одержання субстанції та лікарських форм першого оригінального вітчизняного препарату тіотриазоліну). І.А. Мазуру вдалося об'єднати та спрямувати на досягнення успіху наукові сили медичних вузів і НДІ міст Запоріжжя, Харкова, Києва, Львова, Тернополя, Дніпропетровська, Москви. Результатом цієї роботи став дозвіл до клінічного використання тіотриазоліну (1994 рік), що є апогеєм творчості фармацевтичного хіміка. У теперішній час вітчизняними виробниками (Корпорація «Артеріум») випускається субстанція тіотриазоліну та його лікарські форми — таблетки, ін'єкційні розчини; ін'єкційний розчин і таблетки «Тіоцетам»; таблетки «Тіодарон». Виробництво субстанції тіотриазоліну та його лікарських форм також налагоджено такими фармацевтичними заводами, як АТ «Галичфарм» (ін'єкційний розчин 1 % і 2,5 %, таблетки по 0,1 г); АТ «Червона Зірка», м. Харків (мазь 2 %); завод «Реактив» (субстанція); Дослідний завод ДНЦЛЗ» (очні краплі); ЗАО «Лекхім», м. Харків (супозиторії по 0,2 г); АТ «Галичфарм» (таблетки «Тіоцетам»), завод КМП (таблетки тіотриазоліну, тіоцетаму та тіодарону). Тіотриазолін вийшов за межі лабораторій і почав жити самостійним життям, активно конкуруючи із закордонними аналогами. У теперішній час препарат широко застосовується в Україні і з кожним роком цікавість до нього лікарів зростає. Новим етапом у діяльності НВО «Фарматрон» є реєстрація та продаж препаратів тіотриазоліну та тіоцетаму в ряді країн: Білорусі, Казахстані, Узбекистані, Таджикистані, Молдові та Російській Федерації. Крім того, розроблені та промислово випускаються ветеринарні препарати: вірутрицид, імзауф, трикаптол, азокаптрин, віразол, диверцид, вітурол, тіопротектин.

Професор Мазур І.А. активно пропагує досягнення вітчизняної фармацевтичної хімії, є членом редакційних колегій багатьох наукових журналів, в 1995 році брав участь в організації і створенні наукового збірника «Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики». Професор І.А.Мазур — голова спе-

ціалізованої вченої ради Д 17.600.03 із захисту кандидатських і докторських дисертацій за спеціальністю 15.00.02 «фармацевтична хімія та фармакогнозія», член спеціалізованої вченої ради Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького. І.А. Мазур приділяє багато уваги та часу підготовці наукових кадрів. У межах сформульованого науково-

го напрямку - «пошук, синтез і створення нових лікарських препаратів на основі сполук п'яти-, шестичленних азагетероциклічних сполук та їх конденсованих аналогів» - ним підготовлено більше 40 докторів і кандидатів наук. Його учні очолюють кафедри, напрямки та відділи в органах практичної фармації України і Росії, викладають у вищих навчальних закладах.

*Співробітники, учні та друзі, редакція журналу «Фармаком» щиро вітають шановного Івана Антоновича із ювілеєм, бажають міцного здоров'я, творчого натхнення та подальших успіхів.*

## До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.355:615.074:615.453

Товмасян Е.К.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

### Использование ферментов в фармакопейном тесте «Растворение» для твердых дозированных форм

Проанализирована действующая на сегодня фармакопейная практика использования ферментов при проведении испытания на растворение твердых дозированных форм - желатиновых капсул и таблеток, покрытых желатиновой оболочкой. Обсуждена значимость и практика выполнения конкретного указания относительно использования ферментов в статье USP <711> «Растворение», показаны узкие моменты этой не гармонизированной с Европейской Фармакопеей части статьи USP. Представлены исследования специалистов Американской Фармакопеи по усовершенствованию данного требования. Акцентировано внимание пользователей Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) на этой проблеме и определена возможность введения в соответствующую статью ГФУ национальных требований по стандартизации условий проведения теста «Растворение» при использовании ферментов.

*Ключевые слова:* тест «Растворение», ферменты, стандартизация, твердые дозированные формы.

Для твердых дозированных лекарственных форм (ТДЛФ) для орального применения ключевым вопросом оценки биодоступности, т.е. степени и скорости доставки действующего вещества лекарственной формы в системный кровоток, а также биоэквивалентности, является то, что препарат, прежде всего, должен распадаться и только будучи в растворенном состоянии действующее вещество может быть адсорбировано из ЖКТ [1-4]. Скорость растворения во многих случаях является лимитирующим этапом всего процесса всасывания и, соответственно, проявления терапевтического эффекта лекарственного средства. Показатель «Растворение» является одним из важнейших критериев биофармацевтической классификации препаратов (БКС) и необходимости проведения исследований биодоступности и биоэквивалентности генериков в условиях *in vivo* [2, 5]. Множество исследований привели к расширению области применения теста «Растворение», и в настоящее время он является важным средством характеристики биофармацевтического качества ТДЛФ на различных стадиях его фармацевтической разработки, производства и хранения.

Исторически сложилось, что Американская Фармакопея (USP) [6] является лидером в разработке характеристик растворения *in vitro* для ТДЛФ. Тест <711> «Растворение» был введен в USP еще в 1970 году для таблеток и капсул. Дополнительная информация, часть которой имеет статус рекомендательной, о разработке теста, валидации, оборудовании приведена в общих статьях:

— <724> Drug Release (Высвобождение действующих веществ);

— <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation (Методики проведения теста на растворение: разработка и валидация);

— <2040> Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements (Распадаемость и растворение диетических добавок).

Кроме того, условия проведения испытания и нормирование введены в 558 монографий на конкретные дозированные формы [6].

В Европейскую Фармакопею (EP) 7-го издания [7] и, соответственно, в Государственную Фармакопею Украины (ГФУ) [8] введена общая статья «2.9.3. Тест «Растворение» для твердых дозированных форм», которая находится под пристальным вниманием исследователей, претерпевает постоянные существенные изменения в рамках работ по гармонизации требований ведущих Фармакопей [6-9] и прошла многоступенчатый процесс гармонизации.

Статья по растворению считается гармонизированной в ведущих Фармакопеях мира, т.е. USP, EP и Японской Фармакопее (JP) [6, 7, 9], а также в ГФУ [8] по основным, принципиальным аспектам (приборы, условия проведения испытания и критерии оценки). Во вступительной части статьи USP <711> «Растворение» [6] имеется не гармонизированная с EP и JP [7, 9] часть, в которой приведено указание относительно повторного тестирования в присутствии ферментов твердых и мягких желатиновых капсул и таблеток в случае несоответствия требованиям теста. Звучит это следующим образом: «Для твердых и мягких желатиновых капсул и таблеток, покрытых желатиновой оболочкой, при невыполнении требований по тесту «Рас-

творение», испытание повторяют следующим образом. Если для испытания в частной статье указана вода или среда растворения, рН которой менее 6.8, при повторном испытании можно использовать ту же среду растворения, но с прибавлением очищенного пепсина до активности не более 750000 Единиц или менее на 1000 мл. Для сред, рН которых  $\geq 6.8$ , можно прибавлять панкреатин до активности не более 1750 Единиц или менее на 1000 мл».

Эти несколько предложений провоцируют множество вопросов и проблем, в частности:

- когда конкретно следует повторять тест с использованием ферментов: использовать ли ферменты во всех случаях, когда получены отрицательные результаты, или в определенных случаях;
- как работают указанные ферменты, в установленных концентрациях и насколько стандартизованы, достоверны условия проведения испытания и оценка результатов.

В отличие от USP [6], в ЕР [7] и ГФУ [8], нет никаких конкретных указаний относительно повторных испытаний для желатиновых капсул. При очередном пересмотре в ЕР 5.3 [10], в статье 2.9.3. появилась не гармонизованная информационная часть: «Руководство по проведению теста «Растворение»», где в разделе «Экспериментальные условия проведения испытания» есть только указание о допустимости применения ферментов, поверхностно активных веществ как компонентов среды растворения в специальных случаях. Позже, в ЕФ 6.8 (2010 год), Руководство было выведено из статьи 2.9.3 в отдельную статью в разделе общие тексты под номером 5.17.1. *Руководство по проведению теста «Растворение»*. Аналогично с ЕФ данное Руководство появилось в Дополнении 2 ГФУ 1-го изд. (2008 год) и, соответственно, при переиздании ГФУ планируется полная гармонизация с форматом ЕФ.

Целью данной статьи является анализ действующей на сегодня фармакопейной практики использования ферментов при проведении теста на растворение твердых дозированных форм — желатиновых капсул и таблеток, покрытых желатиновой оболочкой, обсуждение значимости и практики выполнения конкретного указания относительно использования ферментов в статье USP <711> «Растворение», узких моментов этой не гармонизованной с ЕР и JP части статьи USP; представление исследований специалистов USP по усовершенствованию данного требования; определение возможности введения в соответствующую статью ГФУ национальных требований по стандартизации

условий проведения теста «Растворение» при использовании ферментов.

Проблемы стандартизации теста «Растворение» и вопросы усовершенствования фармакопейных требований к этому тесту были темами обсуждения семинара по проблемам теста «Растворение», прошедшего в июне 2012 в USP (Роквилл, Мериленд) [11]. Над решением некоторых актуальных проблем по пересмотру требований по использованию ферментов в тесте растворение желатиновых капсул и таблеток, покрытых желатиновой оболочкой, занималась автор данной статьи Товмасян Е.К. (руководитель направления «Общие статьи на лекарственные формы и фармако-технологические тесты» отдела ГФУ) в рамках программы обмена учеными (Visiting scientist program) с USP (июль-сентябрь, 2012 год) в группе Общих статей «Documentary Standards Division» под руководством научного куратора проекта Маргарет Р.С. Маркус.

#### *Желатин и желатиновые капсулы*

В настоящее время желатин является наиболее широко применяемым веществом при приготовлении капсул [12-14]. Желатин представляет собой продукт частичного гидролиза коллагена — распространенного в природе вещества белковой природы, образующего главную составную часть соединительной ткани позвоночных (прежде всего кожи, костей, сухожилий, рогов, копыт). Коллаген - нерастворимый, высокомолекулярный белок, состоящий из отдельных полипептидных цепей из примерно 1000 аминокислот с наибольшим содержанием (около 60 %) глицина, пролина, гидроксипролина и аланина. Для получения желатина коллаген подвергают мацерации сильными кислотами или щелочами, которые расщепляют его гидролитически на практически неразветвленные аминокислотные цепочки различной длины. Применяющийся способ разложения определяет природу конечного продукта. В зависимости от значения изоэлектрической точки (pI) различают желатин А (кислотный с pI 7-9) и желатин В (щелочной с pI 4.7-5.4). Вследствие используемого процесса производства молекулы желатина проявляют значительную полидисперсность: в зависимости от длины цепи желатин имеет молекулярную массу от 15 000 до 250 000. В основе его молекулы лежит полипептидная цепь, образуемая 19 аминокислотами, основными из которых являются глицин (до 30 %), а также аланин, пролин, гидроксипролин, глутамин. Желатин сохраняет многие химические и физические свойства коллагена

и наиболее важное - способность к гелеобразованию и ассоциации в трехмерные матрицы. Для желатина это термически обратимый процесс при относительно низких температурах, и именно из-за этого качества желатин получил широкое применение в производстве капсул. Различные серии желатина (даже одного производителя) могут различаться по способности к гелеобразованию и прочности образованного геля. Следовательно, контроль прочности геля (так называемая прочность по Блуму) от серии к серии — ключ к получению продукта с воспроизводимыми свойствами. Прочность по Блуму возрастает при увеличении концентрации желатина в геле. рН геля приближается к нейтральному при увеличении средней молекулярной массы желатина. Чем выше прочность по Блуму, тем ниже скорость растворения (и выше стоимость желатина). Обычно производители желатиновых капсул смешивают различные партии желатина для получения массы с наиболее оптимальными характеристиками прочности. Кроме желатина, в состав оболочек капсул входит целый ряд вспомогательных ингредиентов: пластификаторы, консерванты, красители и др.

По своим физическим характеристикам капсулы могут быть классифицированы на 2 типа: твердые и мягкие желатиновые капсулы [7, 8, 13]. Оболочка мягких капсул по сравнению с оболочкой твердых капсул более толстая и эластичная вследствие большего относительно желатина содержания пластификатора. Для твердых капсул вода выполняет роль пластификатора, в то время как для мягких капсул более предпочтительны полиолы с высокой температурой кипения, такие как глицерин и сорбит. Соотношение желатина и пластификатора определяют твердость, хрупкость и растворимость оболочки капсул.

Капсулы также могут быть характеризованы по химическим (гидрофобность или гидрофильность) или по физическим (твердое вещество, раствор или суспензия) свойствам их наполнителя [8, 13].

#### «Старение» или перекрестная сшивка желатина. Поведение таких капсул и таблеток в тесте «Растворение»

Перекрестная сшивка или «старение» желатина - одно из негативных качеств желатина, которое чаще проявляется для мягких капсул в процессе их хранения. Наиболее частыми причинами, вызывающими «старение» желатина, являются альдегиды [13,15] - компоненты препарата, продукты разложения препарата, об-

разуемые *in situ*, в процессе хранения; высокая влажность; разложение стабилизаторов в крахмале, ведущее к образованию альдегида; полиэтиленгликоли, которые могут самоокисляться и образовывать альдегиды; УФ-лучи, особенно в условиях высокой температуры и влажности.

Распространенным типом сшивки является образование ковалентных связей между аминогруппами лизина боковой цепи одной молекулы желатина с такой же аминогруппой другой молекулы. Реакция обычно катализируется следовыми количествами альдегидов (формальдегид, глутаральдегид, глиоксаль) и восстанавливающими сахарами. Образование подобных ковалентных связей, как правило, необратимый процесс и растворение оболочек предполагает ферментное расщепление пептидных связей в белковой молекуле желатина. Другим, более слабым типом сшивки, является комплексообразование свободных карбоксильных групп на двух различных молекулах желатина с трехвалентными ионами  $Fe^{3+}$  и  $Al^{3+}$ .

При испытании на растворение подобные капсулы образуют разбухшую, резиноподобную, не растворимую в воде прозрачную мембрану (Рис. 1) [11], известную как «пелликула» (тонкая пленка), которая обволакивает капсулу снаружи, действуя как барьер, предотвращая или замедляя высвобождение действующих веществ. Однако следует заметить, что ряд исследований *in vivo* продемонстрировали аналогичную биоэквивалентность и биодоступность «старенных» и свежих, не подверженных сшивке, желатиновых капсул [11, 13, 16, 17]. Исходя из этого, еще в USP 25 была введена возможность использования повторного испытания с использованием ферментов.

*Итак, использование ферментов в тесте на растворение предполагается только для перекрестно сшитого желатина. Следует заметить, что этот факт никак не отражен в тексте общей статьи USP (в других фармакопеях тем более). Следовательно, возникает необходимость четкого указания в тексте общей статьи USP случаев, при которых следует повторять испытание и использовать ферменты.*

Возникает правомерный вопрос, как определить, что изменение профиля растворения является следствием «старения» капсул, или какими методами можно определить степень сшивки. Наиболее простым методом можно считать визуальное наблюдение за образованием пелликулы, но следует заметить, что не всегда можно отчетливо зафиксировать ее наличие. Существует спектрофотометрический

метод определения сшивки, но он достаточно трудоемкий и плохо воспроизводим [18]. Как альтернативный метод определения сшивки можно предложить сравнение скорости растворения свежих и «состаренных» капсул.

Отечественная практика входного контроля твердых капсул по тесту «Распадаемость», частично снимает проблему, если гарантировано, что компоненты наполнителя капсул не обладают свойствами катализировать процессы сшивки, и упаковка предохраняет капсулы от стресса. Для мягких капсул отечественного производства с «опасными» наполнителями актуальным остается вопрос подробного изучения в процессе разработки как состава, так и методики проведения теста «Растворение» для адекватной оценки качества препарата.

#### *Ферменты, используемые в тесте «Растворение»*

В тексте общей статьи USP [6] указано:

*«Если для испытания в частной статье указана вода или среда растворения рН, которой менее 6.8, при повторном испытании можно использовать ту же среду растворения, но с прибавлением очищенного пепсина до активности не более 750000 Единиц или менее на 1000 мл. Для сред, рН которых  $\geq 6.8$ , можно прибавлять панкреатин до активности не более 1750 Единиц или менее на 1000 мл».*

Однако, следует заметить, что кривая рН-зависимости активности пепсина (Рис. 2) имеет максимум при рН 2 и практически не наблюдается протеолитической активности при рН 5.5. Если при рН 1.5 пепсин проявляет 90 % своей максимальной активности, то при рН 4.5 - не более 35 % своей максимальной активности [19]. Выше рН 7.5 происходит необратимая инактивация пепсина.

Второй фермент, указанный в тесте на растворение, панкреатин представляет собой комплекс, обладающий амилазной, липазной и протеазной активностью [6, 7, 19, 20]. Именно благодаря протеазной активности, проявляемой трипсиновым компонентом, панкреатин способен расщеплять желатин. Хорошо известно, что оптимумы протеолитической активности для трипсина находятся в пределах рН 7.8-8.7.

Фактически получается, что если процесс растворения капсул следует изучать в промежутке рН 4-6.8 повторно в присутствии фермента, т.е. пепсина, а также при рН  $\geq 6.8$ , то результат будет варьировать в зависимости от реальной активности фермента в среде растворения. Введенные в USP максимальные значения ак-

тивности пепсина и панкреатина установлены в 1998 году рабочей группой по изучению желатиновых капсул FDA [21]. В настоящее время результаты ряда исследователей указывают на необходимость прибавления больших, по сравнению с указанными в USP, количеств пепсина и панкреатина [11, 13].

Следует однако заметить, что по данным специалистов USP, большая часть пользователей не контролирует активность пепсина или панкреатина перед испытанием на растворение, а лишь проводят пересчет активности и количества, необходимого для испытания, исходя из сертификата. В этой связи также возникают вопросы и возможности получения неоднозначных результатов. Общеизвестно, что производители, поставщики ферментов в спецификации приводят пределы активности и при испытании на растворение пользователь может проводить расчет, исходя как из минимума указанной активности, так и из максимума, при этом получая совершенно различные профили растворения. По сути, по тексту общей статьи нет противоречий, но, соответственно, нет и строгой стандартизации для объективной оценки результата.

Исходя из этих данных и соображений, в USP обсуждается вопрос о целесообразности введения в текст общей статьи уточнений относительно необходимости определения активности ферментов перед проведением испытания на растворение [11, 13, 14]. Если для определения протеолитической активности панкреатина в соответствующих монографиях приведена фармакопейная методика [6, 7], то для пепсина в разделе «Реактивы» [6] ранее был введен полуколичественный метод определения активности по расщеплению яичного альбумина с последующим определением нерасщепленного остатка. Данный метод был весьма трудоемкий (инкубация в течение 2.5 ч) и плохо воспроизводим.

В лаборатории USP на основе метода, приведенного в [22], уже разработана и введена в USP36-NF31 быстрая методика определения активности, основанная на способности пепсина расщеплять гемоглобин, и использовании после осаждения трихлоруксусной кислотой нерасщепленной субстанции прямого спектрофотометрического определения образованного тирозина. Аттестован стандартный образец субстрата (гемоглобина) и фермента. Акцент при разработке был поставлен на ускорение и упрощение методики определения активности пепсина, для наиболее удобного, оперативного применения в тесте растворения. При разработ-

ке теста по определению активности были проведены тщательные исследования по изучению действия сред растворения на активность пепсина. Полученные результаты указывают [11], что большая часть сред растворения, применяемых в тестах, приведенных в монографиях на ГЛС в USP и базе FDA [23], за исключением сред с фталатной кислотой, существенно не влияют на активность пепсина.

Другой важной проблемой при обсуждении вопроса использования ферментов в тесте растворения является допустимость использования детергентов и их совместимость [11, 13].

*Детергенты, используемые в тесте «Растворение»*

Наиболее часто используемыми в фармацевтической практике в качестве компонентов лекарственных средств и сред растворения являются детергенты, приведенные в Табл. 1 [13, 23]. Известно, что детергенты можно классифицировать как анионные, катионные, нейтральные (неионные) и цвиттерионные/амфотерные [24, 25]. Практически все нейтральные детергенты не денатурируют белки, в то время как ионные детергенты даже при очень низких концентрациях (несколько мМ) вызывают денатурацию белков. Более того, анионные детергенты оказывают более разрушительное действие, чем катионные [24]. Неионные детергенты обычно практически инертны по отношению к водорастворимым белкам, но сильно взаимодействуют с липофильными [25].

Специалисты USP считают целесообразным при разработке теста «Растворение» в средах, содержащие детергенты, а также для лекарственных средств, в состав которых входят детергенты, особенно, если предполагается повторное проведение исследования с прибавлением ферментов, провести изучение эффектов детергентов, их концентраций и условий проведения испытания. Есть данные о необходимости разделения во времени процесса растворения в среде с детергентом и прибавленным ферментом [11]. Так, в частности, при использовании натрия додецилсульфата (SDS) предлагается первые не более 15 мин проводить испытание с ферментом при отсутствии SDS, после чего только прибавлять детергент [11]. Принципиально то, что следует четко прописать процедуру повторного испытания с ферментом, и в любом случае начало повторного испытания считать с момента введения капсулы в среду растворения.

*Предполагаемые USP изменения в общей статье <711> Растворение*

Экспертная группа USP в настоящее время предлагает существенно расширить текст с не гармонизированными требованиями, где дано указание об использовании ферментов. Предполагается введение четкого разъяснения относительно повторного испытания с применением ферментов. Предложено также привести отдельные подразделы с более подробными указаниями для:

Таблица 1  
Детергенты, наиболее часто используемых в тесте «Растворение», и их максимальные концентрации

Анионные	Катионные	Неионные	Амфотерные
Sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) ((0.01-2.25)%)	Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)(1 %)	Polysorbates (Tween™) ((0.35-5) %)	Lauryl dimethylamine oxide (dodecyldimethylamine oxide-DDAO) (0.5%)
Bile salts (sodium deoxycholate, sodium cholate)	Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB/HDTMA) ((0.5-6) %)	Octoxynol (Triton X100™) (10 %)	Lecithin
	Methylbenzethonium chloride (Hyamine™) (0.5 %)	N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide (1000 mg)	
		Brij 721 (polyoxyethylene lauryl ether - Brij 35 – 0.025 %)	
		Polyoxyl castor oil (Cremophor™) (1 %)	
		Nonylphenol ethoxylate (Tergitol™)	
		Cyclodextrins (0.1 %)	
		Polyoxyl 10 lauryl ether(0.6 %)	

- сред с рН < 4.0;
- сред с рН 4.0 -6.8;
- сред с рН ≥ 6.8;
- сред, содержащих детергенты.

Накопленные сегодня результаты дают основание ограничить применение пепсина в пределах рН до 4, а для промежутка рН 4-6.8 изучается возможность применения других ферментов. Возможными ферментами, которые могли бы быть использованы в этом промежутке рН, считают папаин и бромелайн. Обоснованием подобного выбора является тот факт, что указанные ферменты обладают максимальной ферментативной активностью именно в этой области рН, высоко стабильны и коммерчески доступны (много поставщиков, низкая стоимость). В связи с этим возникает правомерный вопрос: если пепсин и панкреатин являются типичными для организма физиологическими ферментами и их использование не противоречит *in vivo/in vitro*-корреляции теста, то предложенные ферменты не являются таковыми. Однако следует подчеркнуть, что использование ферментов (как пепсина, панкреатина, так папаина и бромелайна) в тесте на растворение преследует одну единственную задачу - расщепить пептидные связи в «состаренном» желатине и разрушить желатиновую капсулу, что даст возможность изучить динамику высвобождения действующего вещества.

Уже есть данные [11] о благоприятном эффекте папаина и бромелайна на *in vitro*-растворение искусственно «состаренных» капсул в области рН 4.0-6.5. В настоящее время в лабораториях Capsugel, Abott и USP запланированы исследования по определению сравнительной активности этих ферментов с пепсином в аналогичных условиях проведения испытания в зависимости от различной степени сшивки желатиновых капсул; по определению максимально допустимой активности ферментов для использования в данном тесте; по разработке и стандартизации метода определения ферментативной активности; эквивалентности выбора между этими 2 ферментами и др.

#### Выводы

Таким образом, отсутствие в ЕФ, и соответственно в ГФУ, какой-либо конкретики относительно использования протеолитических ферментов, с одной стороны, дает свободу производителям в выборе состава сред растворения, в плане применения в них ферментов, но, с другой стороны, не позволяет выставлять четкие фармакопейные требования к их использованию.

На сегодняшний день нет достоверных данных о состоянии вопроса в отечественной практике, но, исходя из номенклатуры выпускаемых отечественных препаратов, в частности, жидких витаминных препаратов в мягких капсулах, некоторых других препаратов в виде капсул можно сделать вывод об актуальности данной проблемы.

На наш взгляд, поднятые специалистами USP вопросы, предпринимаемые ими усилия для их решения весьма востребованы и научно обоснованы. Надеемся, что исследования, начатые специалистами USP в скором времени приведут к реальным результатам, т.е. к появлению соответствующего проекта общей статьи по тесту на растворение. Нашей же задачей является акцентирование внимания пользователей ГФУ на данной проблеме. Считаем необходимым порекомендовать им более детально разрабатывать испытания на растворение твердых желатиновых капсул и таблеток с учетом особенностей «старения» и необходимости повторного тестирования с использованием ферментов. Для разработки национальных дополнений к соответствующей статье ГФУ, т.е. 5.17.1. *Руководство по проведению теста «Растворение»* по этому вопросу, нам особо важно получить результаты практических исследований отечественных производителей, проанализировать их опыт и предложения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриева М.В. «Про проект общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «2.9.3. Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» / М.В. Дмитриева, Е.К. Товмасын, А.И. Гризодуб // Фармаком. — 2007. - № 1. - С. 18-25.
2. Левін М.Г. Тест «Розчинення» в комплексі проблем створення і реєстрації твердих оральних генеричних препаратів / М.Г. Левін, Т.В. Герасимчук // Вісник фармакології та фармації. — 2006. - № 8. - С. 49-65.
3. Guidance for Industry. SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. - US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, 1997. — Режим доступа: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
4. Guidance for industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. - US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, 1997. — Режим доступа: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
5. Соловьев А.И. Исследования биодоступности и биоэквивалентности лекарственных средств в условиях *in vitro* / А.И. Соловьев // Вісник фармакології та фармації. — 2006. - № 8. — С. 49-65.
6. The United States Pharmacopoeia and National Formulary USP35-NF30. — Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2012. — Режим доступа: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>.



7. European Pharmacopoeia. - 7<sup>th</sup> ed. — Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2011. — 3310 p.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» — 1-е вид. - Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. — С. 66-70.
9. Japanese Pharmacopoeia. - 16<sup>th</sup> ed. - The ministry of Health, Labour and Welfare, 2011. — 1788 p.
10. European Pharmacopoeia. - 5<sup>th</sup> ed. — Supplement 3. — Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2006. - P. 3353-3362.
11. Challenges in Dissolution Workshop, June 11-12, 2012, Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2012. - Режим доступу: <http://www.usp.org>.
12. Jolley J.E. The microstructure of gelatin binders / J.E. Jolley // *Photogr. Sci. Eng.* - 1970. - Vol. 14, № 3. — P. 167-177.
13. Stimuli to the Revision Process / Margareth R.C. Marques, Ewart Cole, Dale Kruep, Vivian Gray, Dennis Murachanian, William E. Brown, Gabriel I. Giancaspro // *Liquid-filled Gelatin Capsules Pharmacopoeial Forum.* — 2009. — Vol. 35, № 4. — P. 1029-1104.
14. Margareth R.C. Marques. Use of enzymes in the dissolution testing of gelatin capsules. — режим доступу: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com>.
15. Digenis G.A. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance / G.A. Digenis, T.B. Gold, V.P. Shah // *J. Pharm. Sci.* — 1994. — Vol. 83, № 7. — P. 915-921.
16. The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules / M.C. Meyer, A.B. Straughn, R.M. Mhatre et al. // *Pharm. Res.* — 2000. - Vol. 17. — P. 962-966.
17. Brown J. The effect of cross — linking on the *in vivo* disintegration of hard gelatin capsules / J. Brown, N. Madit, E.T. Cole, I.R. Wilding, D. Cad // *Pharm. Res.* — 1998. — Vol. 15. — P. 1026-1030.
18. Bubnis W.A. The determination of amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrometric method using trinitrobenzenesulfonic acid / W.A. Bubnis, C.M. Ofner III // *Analytical biochemistry.* — 1992. — Vol. 207. - P. 129-133.
19. Piper D.W. pH stability and activity curves of pepsin with special reference of their clinical importance / D.W. Piper, B.H. Fenton // *Gut.* — 1965. - Vol. 6. — P. 506-508.
20. Gallery J. Pepsin and Pancreatin performance in the dissolution of cross-linked gelatin capsules from pH 1 to 8 / Jean Gallery, Jian-Hwa Han, Chiramel Abraham // *Pharmaceutical Forum.* — 2004. - Vol. 30, № 3. - P.1084.
21. Gelatin Capsule Working Group: Collaborative Development of Two-Tier Dissolution Testing for Gelatin Capsules and Gelatin-Coated Tablets using Enzyme Containing Media // *Pharmaceutical Forum.* - 1998. - Vol. 24. — P. 7046-7050.
22. Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin/ M.L. Anson // *J. of General Physiology.* — 1938. - P. 79-89.
23. FDA Dissolution Test Database. — Режим доступу: [www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm). - Заголовок с титул. екрана.
24. Bartnik, F.G. Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranes / F.G. Bartnik // *Anionic Surfactants: Biochemistry, Toxicology.* — 1993. — Vol. 43. — P. 1-43.
25. Otzen D. Protein-surfactant interactions: A tale of many states / D. Otzen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics.* — 2011. — Vol. 1814, № 5. — P. 562-591.
26. Arnon, R. Papain // *Methods in Enzymology / Eds. G. Perlmann, L. Lorand.* — Vol. 19. - NY: Academic Press, 1970. — P. 226-245.
27. Murachi T. Bromelain Enzymes // *Methods in Enzymology / Eds. G. Perlmann, L. Lorand.* — Vol. 19. - NY: Academic Press, 1970. — P. 273-284.

#### Резюме

Товмасян Є.К.

#### Використання ферментів у фармакопейному тесті «Розчинення» для твердих дозованих форм

Проаналізовано діючу на сьогодні фармакопейну практику використання ферментів при проведенні випробування на розчинення твердих дозованих форм — желатинових капсул і таблеток, покритих желатиновою оболонкою. Обговорено значущість і практику виконання конкретної вказівки щодо використання ферментів у статті USP <711> «Розчинення», показано вузькі моменти цієї не гармонізованої із Європейською Фармакопеєю частини статті USP. Представлено дослідження спеціалістів Американської Фармакопеї з удосконалення даної вимоги. Акцентовано увагу користувачів Державної Фармакопеї України (ДФУ) на цій проблемі та визначено можливість введення до відповідної статті ДФУ національних вимог зі стандартизації умов проведення випробування «Розчинення» при використанні ферментів.

*Ключові слова:* тест «Розчинення», ферменти, стандартизація, тверді дозовані форми.

#### Summary

Tovmasyan E.K.

#### Use of enzymes in the pharmacopoeial test «Dissolution» for solid dosage forms

The current pharmacopoeial practice of the use of enzymes at the dissolution test of solid dosage forms (capsules and coated tablets) has been examined. An importance and practice of implementation of specific Guidance on the use of enzymes in accordance with the USP article <711> "Dissolution" have been discussed; narrow points of this unharmonized with the European Pharmacopoeia part of the USP article have been demonstrated. Studies of the American Pharmacopoeia specialists on improvement of this requirement have been presented. The attention of users of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) has been focused on this problem; a possibility of introducing to the relevant SPU article of some national standardization requirements for the conditions of the performing of the test «Disolution» with the use of enzymes has been determined.

*Key words:* test «Dissolution», enzymes, standardization, solid dosage forms.

**Товмасян Ерануи Карпетовна.** Окончила Єреванський державний університет (1984). К.б.н. Ст. науч. сотр. (2006). Руководитель научных направлений «Общие статьи на дозированные лекарственные средства и фармако-технологические испытания» и «Общие статьи и монографии на биологические продукты» отдела ГФУ ГП УНФЦКЛС. Ученый секретарь ГП УНФЦКЛС.

Котова Е.Е., Котов А.Г., Вовк О.Г.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

## Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Буркун»

Проведено порівняльний аналіз підходів щодо стандартизації якості сировини буркуну. Показано необхідність при розробці монографії ДФУ включення до національної частини дозволу на використання двох видів буркуну; а саме: *Melilotus officinalis* (L.) Pall. і *Melilotus altissimus* Thuill. На підставі аналізу досліджуваних зразків сировини розроблено розділи «Макроскопія» та «Мікроскопія», валідовану спектрофотометричну методику визначення суми кумаринів у сировині. Розроблено проект монографії ДФУ «Буркун» із відповідною національною частиною.

**Ключові слова:** Державна Фармакопея України, *Melilotus* Mill., лікарська рослинна сировина, стандартизація

Буркун (*Melilotus* Mill.) – рід дворічних, рідше однорічних рослин родини бобових (*Fabaceae*) об'єднує близько 20 видів, що зустрічаються в Європі, Північній і Середній Азії, Північній Африці, Північній Америці та Австралії [1]. На території країн колишнього СРСР зростає 12 видів буркуну [2], у флорі України представлено 8 видів [3]. У культурі найбільшого поширення набули б. білий (*M. albus* Medik.) і б. лікарський (*M. officinalis* (L.) Pall.) [4].

Назва роду *Melilotus* походить від грецького meliloton (meli – мед; lotos (лотос, різновид конюшини), що у перекладі означає «медова конюшина». Види буркуну – добрі медоноси, їх квітки приваблюють бджіл, а листки у них трійчасті, як у конюшини.

Серед видів цього роду широко відомий б. лікарський (*M. officinalis*) – як рослина із цілющими та барвними властивостями, використовується науковою та народною медициною. Лікарською рослинною сировиною (ЛРС) найчастіше є буркуну трава.

Діючі речовини *M. officinalis*: кумарин (0.3 % - 0.9 %), ціс-о-кумарової кислоти глікозид (мелілотозид, 0.5 %), 3,4-дигідрокумарин (мелілотин), скополетин, умбеліферон. У надземній частині рослини знайдено флавоноїдні сполуки – глюкозиди кемпферолу та кверцетину, вуглеводи, тритерпенові сполуки, амінокислоти, дубильні речовини, каротиноїди. У числі супутніх речовин присутні похідні пурину (алантоїн і алантоїнова кислота), холіну та слизистих речовин. Стебла майже не містять біологічно активних речовин. Схожий хімічний склад і фармакологічну дію мають б. високий [*M. altissimus* Thuill.] і б. білий [*M. albus* Medik.], поширені разом із б. лікарським [4, 5, 6].

Біологічну активність рослини в цілому визначають фармакологічні властивості кумарину. Кумарин б. лікарського пригнічує центральну нервову систему (ЦНС), виявляє протисудомну дію, підвищує систолічний артеріальний тиск, збільшує хвилинний об'єм серця, покращує мозкове та периферичне кровопостачання та

кровообіг органів черевної порожнини. Б. лікарського трава входить до державного реєстру лікарських засобів як кератолітичний, біостимулювальний, церебровасодилатувальний, антикоагулянтний, відхаркувальний та протизапальний засіб.

ЛРС б. лікарського використовують також як засіб антисептичної, терпкої, болезаспокійливої, седативної, заспокійливої, вітрогінної та діуретичної дії, а також при болях у серці, головних болях, безсонні, неврастенії. В індійській медицині буркун застосовується як ароматичний, пом'якшувальний, вітрогонний і кровоспинний засіб. В Австрії буркуну трава називається «медовою конюшиною» і застосовується у вигляді настою при захворюваннях шлунка, бронхітах, як зовнішній засіб у вигляді припарок. Препарати буркуну застосовуються як зовнішній подразливий та пом'якшувальний засіб для припарок. Із буркуну трави готують зелений пластир для припарок, дрібнені листки прикладають до гнійних ран, довго незагойних виразок. Крім того, буркуну трава входить до складу грудних і проносних зборів [4].

ЛРС – висушені квітучі верхівки б. лікарського описані у Фармакопеях СРСР (ГФ I-VIII видань). Б. лікарський є офіційним видом у Німеччині, Австрії, Польщі, Румунії, Голландії.

В Росії, країнах колишнього СРСР, а також до недавнього часу в Україні якість ЛРС буркуну регламентувалася вимогами ГОСТ 14101-69 «Трава донника». Ідентифікація ЛРС за цим НД проводиться лише методами макро- і мікроскопії, кількісна оцінка БАР у сировині відсутня [7].

У монографії ЄФ «*Melilot*» [8], як і в монографії ДАС «*Steinklee*» [9] кількісно оцінюється вміст кумарину у сировині методом ВЕРХ, проте регламентація різна: від 0.1 % до 0.3%.

Мета даної роботи – дослідження якості ЛРС буркуну, використовуваної в Україні, для розробки вимог національної законодавчої бази – Державної Фармакопеї України

(ДФУ) — на даний вид ЛРС, гармонізованих із вимогами ЄФ.

Використовуючи розроблений алгоритм [10, 11] і враховуючи те, що досліджувану сировину не описано в ГФ XI, для досягнення даної мети вирішувалися такі завдання: проведення порівняльного аналізу показників якості ЛРС буркуну за статтею ГФ VIII, монографією ДАС, ГОСТ та монографією ЄФ «*Melilot*»; дослідження вітчизняної сировини на відповідність цим документам; на підставі результатів даних досліджень розробка монографії ДФУ «Буркун» із відповідною національною частиною, що враховує якість сировини, використовуваної вітчизняними виробниками.

У результаті порівняння вимог щодо якості сировини, описаних у даних документах, з'ясоване наступне.

Визначення ЛРС. У статті 291 ГФ VIII [12] «Трава донника» описано висушені листки та квітки без стебел б. лікарського (*M. officinalis* (L.) Desr.), а в розділі «Возможные подмеси» дозволено використання б. високого (*M. altissimus* Thuil.).

Вимоги ГОСТ 14101-69 [7] розповсюджується на висушену цільну, різану й обмолочену траву б. лікарського (*M. officinalis* (L.) Desr.) і б. високого (син. б. рослого) — *M. altissimus* Thuil. Таким чином, на відміну від ГФ VIII, ГОСТ дозволив використання в якості офіційної ЛРС, по-перше, трави, а не тільки листків і квіток рослини, а по-друге — використання двох видів: б. лікарського та б. високого.

ЄФ містить монографію «*Melilot*», в якій описані цілі або різані, висушені надземні частини *M. officinalis* (L.) Lam.

ДАС в монографії «Steinklee» описує висушені, цілі або різані надземні частини *M. officinalis* (L.) Lam. et Thuill. і *M. altissimus* Thuill. (*Fabaceae*).

Слід зауважити, що відповідно до сучасної ботанічної номенклатури *M. officinalis* (L.) Lam., *M. officinalis* (L.) Desr. є синонімами *M. officinalis* (L.) Pall. [2, 13].

Таким чином, на відміну від ЄФ і ГФ VIII, як ГОСТ, так і ДАС дозволяють використання у фармації двох видів буркуну, а саме — *M. officinalis* (L.) Pall. і *M. altissimus* Thuill.

**Макроскопія.** Опис макроскопічних (зовнішніх) ознак даного виду ЛРС, що містяться у зазначених НД, наведено в Табл. 1.

Аналіз даних, наведених у Табл. 1, переконує в тому, що до національної частини монографії ДФУ «Буркун» необхідно ввести ЛРС двох видів: *M. officinalis* (L.) Pall. і *M. altissimus* Thuill. У розділі «Ідентифікація А» (опис макроскопічних діагностичних ознак ЛРС) не-

обхідно враховувати не лише вимоги ЄФ, де охарактеризовані морфологічні ознаки лише ЛРС *M. officinalis*. В ГОСТ та монографії ДАС наведено спільні та відмінні риси двох видів *M. officinalis* і *M. altissimus*, але у даних документах також виявляються розбіжності, а саме, за ГОСТ ці два види буркуну відрізняються опушенням чашечки: у б. лікарського чашечка гола, а у б. високого опушена, за ДАС чашечка у обох видів дрібно опушена.

Слід відмітити, що кількість зубчиків вздовж краю листочків (у *M. officinalis* (10-13), у *M. altissimus* — (8-20)), які ГОСТ наводить у якості відмінності, не є діагностичною ознакою, бо їх кількість у *M. altissimus* повністю перекриває число зубчиків у *M. officinalis*, тому цю ознаку не доцільно вводити до національної частини монографії ДФУ як діагностичну для ідентифікації зазначених видів.

Крім того, в [2, 14] для даного виду ЛРС наведено кількісні та деякі якісні ознаки віночка та боба, а саме, у *M. officinalis*: віночок: (4.5-5) мм завдовжки, біб (2.5-4) мм завдовжки із голою, зморшкуватою поверхнею; у *M. altissimus*: віночок (5.5-7) мм завдовжки, біб (4-6) мм завдовжки із притиснуто опушеною, сітчасто зморшкуватою поверхнею. Ці відміни є додатковими, специфічними видовими ознаками, їх введення до національної частини монографії ДФУ сприятиме точнішій діагностиці ЛРС.

Також слід звернути увагу, що на відміну від ЄФ, ГОСТ і ДАС підкреслюють характерні властивості зазначеної ЛРС щодо її запаху та смаку.

**Мікроскопія.** Опис характерних мікроскопічних ознак досліджуваної ЛРС, представлених у зазначених НД, наведено в Табл. 2.

Вивчаючи дані, наведені у Табл. 2, у першу чергу, слід відмітити різну техніку визначення мікроскопічних характеристик сировини в різних НД: в ГФ VIII і ГОСТ — це переглядання листка (вигляд зверху) після попередньої обробки лугом/або без такої обробки, в ЄФ — це мікроскопічне дослідження подрібненої на порошок сировини, у монографії ДАС використовуються обидві техніки.

Враховуючи те, що для монографій ДФУ першочерговими є вимоги ЄФ [15, 16, 17] щодо їх будови та формату, даний розділ необхідно розробити для подрібненої на порошок сировини із обов'язковою регламентацією всіх діагностичних ознак, описаних в НД, які є діючими на території України.

Крім того, слід відмітити, що на нинішній час в ЄФ активно дискутується питання, щодо додаткових мікроскопічних ознак сировини

Таблиця 1

## Макроскопічні ознаки ЛРС буркуну, регламентовані різними НД

НД, вид ЛРС	Макроскопічні ознаки	Колір	Запах, смак
ГФ VIII, <i>M. officinalis</i>	Суміш квіток і листків, крупно подрібнених, із незначною домішкою зеленуватих, тонких, поламаних стебелець і плодів на різних стадіях зрілості. Листочки зелені, голі, нижні – обернено-яйцеподібні, верхні – видовжено-ланцетні, на верхівці заокруглені, з дрібнозубчастими краями, завдовжки (1-3) см; трапляються цілі довгочерешкові трійчасті листки. Кінцевий листочок (1-4) см завдовжки, дещо довший бічних і має довший черешок. Прилистки довгошиловидні, цілокраї. Квітки дрібні, (5-7) мм завдовжки, неправильні, метеликові, з яскравими жовтими пелюстками та зеленою чашечкою. Чашечка дзвоникovidна, п'ятизубчата, залишається при плоді. Віночок складається з вітрила, дещо виімчастого на верхівці, двох крил із вушками біля основи та зрослопелюсткового, коротшого човника. Тичинок 10, 9 із них зрослися, 10-а (верхня) вільна. Стовпчик довгий, зав'язь верхня. Плоди дрібні, одно-двонасінні боби, (3-6) мм завдовжки, яйцевидні, буруваті, дрібно зморшкуваті, з непадаючою буруватою чашечкою.	Листочки зелені. Квітки з яскраво-жовтими пелюстками та зеленою чашечкою. Плоди буруваті.	Запах приємний, кумариновий, смак солодкуватого-гіркий.
ГОСТ 1401-69, <i>M. officinalis</i> і <i>M. altissimus</i>	Цільні облистяні квітучі верхівки та бічні гілочки рослин зі стеблом до 3 мм у діаметрі та до 30 см завдовжки. Прилистки ланцетні або шилоподібні, майже завжди цілокраї, зрідка у найнижчих листків із (1-2) зубчиками. Нижні листочки обернено-яйцеподібні, верхні – довгасті або ланцетні, вздовж краю з обох боків із (10-13) <b>нерівними зубчиками</b> у <i>M. officinalis</i> та з (8-20) <b>зубчиками</b> у <i>M. altissimus</i> . Квітки метеликові, дрібні, (5-7) мм завдовжки. Чашечка дзвоникувата, п'ятизубчата, залишається при плоді, <b>гола</b> у <i>M. officinalis</i> та <b>опушена</b> у <i>M. altissimus</i> . Іноді трапляються декілька дрібних незрілих плодів – бобів (3-5) мм завдовжки, нечітко сітчастих або поперечно-зморшкуватих, голих або вкритих рідко розташованими волосками. Насінина одна, зрідка – дві.	Стебла, чашечки та плоди зелені, віночки жовті.	Запах ароматний (кумариновий) смак гіркуватий.
ДАС, <i>M. officinalis</i> і <i>M. altissimus</i>	Стебло до 5 мм завдовжки, порожнисте або заповнене м'якою білуватою серцевиною, подовжньо борозенчасте. Листки чергові, трійчасті. Вони рідко опушені, із черешком до 1 см завдовжки, біля основи якого наявні 2 шилоподібні, нерозчленовані прилистки; середній листочок дещо крупніший і також має дещо довший черешочок. Листочки цільні, із пластинкою до 4 см завдовжки, від видовженої до еліптичної форми, на верхівці виімчасті, із дуже маленьким, гострим вістрям, клиноподібною основою, голі або опушені на нижній поверхні вздовж середньої жилки, вздовж краю гостро зубчасті. Суцвіття складається із пухких, пазушних, від 5 см до 7 см завдовжки, однобічних китиць. Жовті, численні квітки метеликового типу висять на від 1 мм до 2 мм завдовжки, шовковисто опушених квітконіжках, у пазухах маленьких, червонуватих, опушених покривних листочків. Дрібноопушена чашечка п'ятизубчата, оточує після цвітіння дрібний, яйцеподібний, від жовтавого до коричневого кольору, одно- або двонасінний біб, у <i>M. officinalis</i> <b>біб голий, поперечно зморшкуватий</b> , у <i>M. altissimus</i> <b>біб розсіяно опушений, сітчасто зморшкуватий</b> .	Квітки жовті, численні. Біб від жовтавого до коричневого кольору	Запах сильний, кумариновий, смак гострий. При розжовуванні ослизнюється.

Таблиця 1 (продовження)

НД, вид ЛРС	Макроскопічні ознаки	Колір	Запах, смак
ЄФ, М. <i>officinalis</i>	Стебло зелене, циліндричне, голе, тонко ребристе. Листки чергові, черешкові, трійчасті, із 2 ланцетними прилистками; листочки близько 3 см завдовжки, 20 мм завширшки, від видовжених до яйцеподібних, із дрібнозубчастим краєм, загостреною верхівкою та клиноподібною основою; верхня поверхня темно-зелена та гола, нижня поверхня блідо-зелена, вкрита короткими, тонкими волосками, особливо біля основи. Суцвіття — китиця із численних блідо-жовтих квіток, близько 7 мм завдовжки, кожна квітка має опушену чашечку із 5 глибоко розділеними, нерівними зубцями та метеликовий віночок. Плід — однонасінний біб, жовтаво-коричневий, короткий і загострений на верхівці, часто він знаходиться у неоппадаючій чашечці; поверхня боба гола та поперечно зморшкувата.	Стебло зелене, квітки блідо-жовті. Плід жовтаво-коричневий.	—
ДФУ <sup>N</sup> , М. <i>officinalis</i> і М. <i>altissimus</i>	Стебло зелене, циліндричне, до 5 мм у діаметрі, порожнисте або заповнене м'якою, білуватою тканиною, голе, ребристе або тонко подовжньо борозенчасте. Листки трійчасті, чергові, із черешком до 1.5 см завдовжки та 2 вузько ланцетними або шилоподібними, частіше цільними прилистками. Листочки цільні, близько від 2 см до 4 см завдовжки, від 10 мм до 20 мм завширшки, від видовженої до яйцеподібної або еліптичної форми, із перистим жилкуванням, дрібнозубчастим краєм, загостреною, тупуватою або виїмчастою верхівкою із маленьким гострим вістрям та клиноподібною основою; верхня поверхня листочків темно-зелена, гола, нижня — блідо-зелена, вкрита короткими, тонкими волосками, особливо біля основи та вздовж середньої жилки. Суцвіття — волоть, що складається із пазушних, пухких, однобічних китиць, від 5 см до 7(9) см завдовжки, із численних блідо-жовтих квіток, близько (5-7) мм завдовжки. Квітка має шовковисто опушену квітконіжку від 1 мм до 2 мм завдовжки, зрослолисту, п'ятизубчасту чашечку, опушену дрібними волосками, та метеликовий віночок: у <i>M. officinalis</i> від 4.5 мм до 5 мм завдовжки, у <i>M. altissimus</i> від 5.5 мм до 7 мм завдовжки. Плід — одно- або двонасінний біб, від жовтавого до коричневого кольору, яйцеподібної форми, загострений на верхівці, часто він знаходиться у неоппадаючій чашечці. У <i>M. officinalis</i> біб (2.5-4) мм завдовжки, із голою, зморшкуватою поверхнею, у <i>M. altissimus</i> біб (4-6) мм завдовжки, із притиснуто опушеною, сітчасто зморшкуватою поверхнею.	Стебло зелене, верхня поверхня листочків темно-зелена, нижня блідо-зелена. Квітки блідо-жовті. Плід від жовтавого до коричневого кольору.	Запах характерний, приємний, кумариновий, смак, гіркуватий.

Примітка.

Жирним шрифтом виділено відмінні макроскопічні ознаки *M. officinalis* і *M. altissimus*.

буркуну, а саме: опис крупних жилок, оточених кристалоносною обкладкою із призматичними кристалами кальцію оксалату; фрагментів паренхіми, окремі клітини якої містять друзи кальцію оксалату; фрагментів пелюсток із довгастих, більш-менш прямокутних клітин епідерми зі звивистими оболонками та тонкими спіральними судинами. Питання про введення даних ознак до розділу «Ідентифікація В» національної частини монографії ДФУ можна вирішувати після відповідного аналізу вітчизняної сировини.

Показники якості сировини. Перелік показників якості сировини, що регламентуються у зазначених НД, наведено в Табл. 3.

*Ідентифікація С.* Як було зазначено вище, як у статті ГФ VIII, так і в ГОСТ відсутні додаткові методики ідентифікації сировини, окрім визначення макро- і мікроскопічних ознак.

У монографіях ЄФ і ДАС додатково ідентифікацію основних БАР сировини проводять ТШХ-методом, але методики різні. Як розчин порівняння використовують в ЄФ - розчин стандартних речовин — о-кумарової кислоти та ку-

Таблиця 2

## Мікроскопічні ознаки ЛРС буркуну, регламентовані різними НД

НД, вид ЛРС	Мікроскопічні ознаки	Техніка виконання
ГФ VIII, <i>M. officinalis</i>	Розглядають (вигляд зверху) листок, просвітлений лугом. Виявляються: дуже характерні волоски, що складаються із 2 тонкостінних, коротких, мало помітних базальних клітин і 1 довгої, дещо зігнутої кінцевої клітини, дуже потовщеної, з ниткоподібною порожниною та грубобородавчастою кутикулою; зрідка трапляються дрібні головчасті волоски; жилки листка, оточені характерною кристалоносною обкладкою; інші кристали відсутні; пилкові зерна овальні, дещо шипуваті.	Переглядання листка (вигляд зверху) після обробки лугом.
ГОСТ 1401-69, <i>M. officinalis</i> і <i>M. altissimus</i>	Розглядають листок під лугою. Виявляються: клітини нижньої епідерми мають звивистіші оболонки ніж клітини верхньої епідерми; продихові апарати та волоски наявні в обох епідермах; покривні волоски одноклітинні, грубобородавчасті, тонкостінні, із загостреним кінцем; залозисті волоски із багатоклітинною голівкою та короткою ніжкою; середня та крупніші бічні жилки оточені кристалоносною обкладкою; зрідка трапляються друзи кальцію оксалату.	Переглядання листка під лугою.
ДАС, <i>M. officinalis</i> і <i>M. altissimus</i>	<p>1. Переглядають пластинку листка (вигляд зверху) під мікроскопом, використовуючи <i>хлоральгідрату розчин Р</i>. Виявляються клітини верхньої та нижньої епідерми із клітин зі звивистими оболонками та продихові апарати анізоцитного типу (2.8.3). Поодинокі, деколи зовсім відсутні, покривні волоски близько 300 мкм завдовжки, триклітинні, дві нижні клітини дрібні, тонкостінні та невидимі, кінцева клітина довга, товстостінна, із вузькою порожниною та бородавчастою кутикулою. Крім того, виявляються поодинокі залозисті волоски до 70 мкм завбільшки, із від дво- до триклітинною ніжкою та багатоклітинною, булавоподібною голівкою. Мезофіл складається, як правило, із ряду клітин палісади та дещо ширшої губчастої паренхіми. Середня жилка складається із груп волокон із рядами кристалів, численними поодинокими кристалами кальцію оксалату. Пелюстки вкриті описаними бородавчасто потовщеними волосками, на чашечці та зав'язі, крім того, наявні зазначені залозисті волоски. Епідерма пиляка із довгими шипами кутикули. Пилкові зерна близько 25 мкм у діаметрі, еліптичної форми, із 3 проростковими порами. Зовнішній шар перикарпію містить кристали кальцію оксалату.</p> <p>2. Порошок зеленувато-жовтого кольору. У порошку виявляються: численні товстостінні, вузько порожнинні, бородавчасто потовщені покривні волоски; середня жилка із кристалоносною обкладкою; численні пилкові зерна еліптичної форми із 3 проростковими порами; часто фрагменти пластинки листка, жовтих пелюсток; зрідка залозисті волоски із багатоклітинною голівкою, а також ніжкою.</p>	<p>1. Переглядання листка (вигляд зверху) після обробки розчином хлоральгідрату.</p> <p>2. Переглядання сировини, здрібненої на порошок</p>
ЄФ <i>M. officinalis</i>	Порошок жовтаво-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи <i>хлоральгідрату розчин Р</i> . У порошку виявляються: фрагменти пластинки листка (вигляд зверху) із клітинами епідерми із нерівномірно потовщеними, дещо звивистими оболонками та численними продиховими апаратами, звичайно аномоцитного типу із 3-6 побічними клітинами; однорядні покривні волоски із 2 коротких, базисних клітин із гладенькими оболонками та довгою термінальною клітиною, зігнутою під прямим кутом, із товстою оболонкою та бородавчастою кутикулою; зрідка залозисті волоски із короткою, 2-3-клітинною ніжкою та яйцеподібною, дворядною голівкою із 4 нечітких клітин; окремі фрагменти пелюсток із сосочкоподібних клітин; фрагменти провідної тканини стебла із прилеглими, не здерев'янілими, септованими волокнами, що містять призматичні кристали кальцію оксалату; фіброзний шар пиляка; пилкові зерна від кулястої до яйцеподібної форми, близько 25 мкм завдовжки, із 3 порами та гладенькою екзиною.	Переглядання сировини, здрібненої на порошок

Таблиця 2 (продовження)

НД, вид ЛРС	Мікроскопічні ознаки	Техніка виконання
ДФУ <sup>N</sup> , <i>M. officinalis</i> та <i>M. altissimus</i>	Порошок жовтаво-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи <i>хлоральгідрату розчин Р</i> . У порошку виявляються: фрагменти пластинки листка (вигляд зверху) із клітинами епідерми із нерівномірно потовщеними, дещо звивистими оболонками та численними продиховими апаратами, звичайно аномоцитного або анізоцитного типів (2.8.3) із (3-6) побічними клітинами, <b>одна із них часто дрібніша</b> ; покривні волоски однорядні, <b>до 300 мкм завдовжки, триклітинні, із них 2 нижні клітини короткі</b> , із гладенькими оболонками, а термінальна клітина довга, зігнута під прямим кутом, із товстою оболонкою та бородавчатою кутикулою; зрідка залозисті волоски із короткою, 2-3-клітинною ніжкою та яйцеподібною або булавоподібною, дворядною голівкою із 4 нечітких клітин; <b>крупні жилки оточені кристалоносною обкладкою із призматичними кристалами кальцію оксалату; фрагменти паренхіми, окремі клітини якої містять друзи кальцію оксалату; фрагменти пелюсток із довгастих, більш-менш прямокутних клітин епідерми зі звивистими оболонками та тонкими спіральними судинами; фіброзний шар пиляка; пилкові зерна від кулястої до яйцеподібної форми, близько 25 мкм завдовжки, із 3 порами та гладенькою екзиною</b>	Переглядання сировини, здрібненої на порошок

Примітка.

Жирним шрифтом виділено додаткові мікроскопічні ознаки сировини.

Таблиця 3

Показники якості ЛРС буркуну, регламентовані в різних НД

Показник	ГФ VIII	ГОСТ 1401-69	ДАС	ЄФ
<i>ідентифікація С</i> метод ТШХ	—	—	регламентовано наявність зон по відношенню до зон скополетину та кумарину	регламентовано наявність зон о-кумарової кислоти, зони кумарину та зони, розташованої між ними
<i>вологість</i>	не більше 14 %	не більше 14.0 %	—	—
<i>втрата в масі при висушуванні</i>	—	—	не більше 10.0 %	не більше 12.0 %
<i>загальна зола</i>	не більше 10 %	не більше 10.0 %	не більше 9.0 %	не більше 10.0 %
<i>сторонні домішки</i>				
стебла діаметром більше 3 мм	не більше 2 %	не більше 2.0 %	не більше 2 %	не більше 2 %
пожовтілі, побурілі та почорнілі частини рослини	—	не більше 2.0 %	—	не більше 2 %
органічна домішка	не більше 1 %	частини інших не отруйних рослин і недухм'яних видів буркуну — не більше 1 %	—	—
мінеральна домішка	не більше 0.5 %	не більше 0.5 %	—	—
дикумарол (метод ВЕРХ)	—	—	не більше 0.002 %	—
<i>кількісне визначення</i>				
вміст кумарину			не менше 0.1 % (метод ВЕРХ)	не менше 0.3 % (метод ВЕРХ)

марину, при цьому на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зеленувато-жовта флуоресціююча зона на рівні зони кумарину, синя флуоресціююча зона, розташована між зонами кумарину та *o*-кумарової кислоти та може виявлятися зеленувато-жовта флуоресціююча зона *o*-кумарової кислоти на рівні зони *o*-кумарової кислоти на хроматограмі розчину порівняння. В монографії ДАС як розчин порівняння використовують розчин стандартних речовин — скополетину та кумарину, при цьому на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: слабо-голуба та червона флуоресціююча зони на рівні зони скополетину на хроматограмі розчину порівняння, жовто-зелена флуоресціююча на рівні зони кумарину на хроматограмі розчину порівняння, декілька зон різного кольору між зонами скополетину та кумарину, одна або дві червоні зони, розта-

шовані вище зони кумарину на хроматограмі розчину порівняння.

*Сторонні домішки.* Цікавим є підхід щодо ідентифікації та регламентації сторонніх домішок в усіх зазначених НД.

Так, у статті ГФ VIII окрім регламентації вмісту сторонніх домішок (сумарно не більше 1.5 %), як вже зазначалось вище, дозволялась наявність у сировині частин *M. altissimus* Thuil., а частини інших недухм'яних видів буркуну, а саме б. білого (*M. albus* Desr. (Medik.)) із білими квітками та б. зубчастого (*M. dentatus* (Wetk.) Pers.) із жовтими квітками розглядаються як недопустимі домішки.

В ГОСТ, де також регламентується вміст сторонніх домішок (сумарно не більше 1.5 %), у примітках зазначено, що до органічної домішки відносять інші (недухм'яні) види буркуну: б. білий (*M. albus* Desr. (Medik.)) із білими квітками та б. зубчастий (*M. dentatus* (Wetk.)

Таблиця 4

## Результати аналізу досліджуваних зразків буркуну на відповідність вимогам ЄФ та ГОСТ 1401-69

Показник	Нормування	Зразки						
		1	2	3	4	5	6	7
визначення	відповідно до ГОСТ	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає
макроскопія (зовнішні ознаки)	відповідно до ЄФ та ГОСТ	виявлено додаткові макроскопічні ознаки	сировина — майже виключно стебла буркуну	виявлено додаткові макроскопічні ознаки	виявлено додаткові макроскопічні ознаки	виявлено додаткові макроскопічні ознаки	виявлено додаткові макроскопічні ознаки	виявлено додаткові макроскопічні ознаки
мікроскопія	відповідно до ЄФ	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки	відповідає	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки	виявлено додаткові мікроскопічні ознаки
ідентифікація С	відповідно до ЄФ	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає	відповідає
втрата в масі при висушуванні, %	ЄФ- не більше 12 % ГОСТ- не більше 14%	7.8	10.5	7.7	12.5	8.0	11.7	9.4
загальна зола, %	не більше 10	5.5	7.2	4.0	5.2	6.1	4.0	7.7
стебла діаметром понад 3 мм, %	не більше 2	5.0	55.9	7.8	2.4	4.4	9.5	4.7
сторонні домішки, %	ЄФ- не більше 2 ГОСТ- не більше 3.5	5.9	10.8	2.6	1.8	3.7	2.1	3.0
вміст кумарину, %	ЄФ- не менше 0.3 ДАС- не менше 0.1	0.31	0.22	0.42	0.20	0.38	0.17	0.35



Pers.) із жовтими квітками, що відрізняється від б. лікарського крупнішими прилистками із (2-3) зубцями та гострозубчастими листками (кількість зубчиків з обох сторін (15-40)). Крім того, у сировині регламентується наявність поживних, побурілих і почорнілих частин рослини — не більше 2 %.

І ЄФ, і ДАС регламентує вміст сторонніх домішок в сировині на рівні не більше 2 %, однак ЄФ додатково обмежує в сировині вміст стебел діаметром понад 3 мм (як ГФ VIII і ГОСТ), а в монографії ДАС жорстко регламентується методом ВЕРХ вміст дикумаролу — не більше 0.002 %, який, як було зазначено вище, є одним із домінуючих компонентів б. білого. Таку жорстку регламентацію можна пояснити тим, що в Німеччині даний вид ЛРС використовується, у першу чергу, як ароматичний засіб, тому чітко контролюють домішки недухм'яного виду сировини.

**Загальна зола.** Регламентація якості сировини за даним показником у зазначених НД практично однакова: не більше 10 % у ГФ VIII, ГОСТ, ЄФ, не більше 9 % у ДАС.

**Втрата в масі при висушуванні.** За монографією ЄФ і ДАС — не більше 10 % та 12 %, відповідно, за ГФ VIII та ГОСТ — не більше 14 % вмісту вологи в ЛРС.

**Кількісне визначення.** Як зазначалось вище, лише ЄФ і ДАС контролюють кількісний вміст БАР сировини, а саме кумарину методом ВЕРХ, проте з різною регламентацією: ДАС для двох видів буркуну — *M. officinalis* і *M. altissimus* регламентує не менше 0.1 % кумарину, а ЄФ для *M. officinalis* — 0.3 % кумарину.

Таким чином, у результаті порівняння вимог щодо якості досліджуваного виду ЛРС у всіх НД, що вивчались, було виявлено такі проблеми:

- на відміну від ЄФ, в Україні офіційною є сировина двох видів буркуну; а саме *M. officinalis* і *M. altissimus*, тому при розробці монографії ДФУ необхідним є введення до національної частини дозволу на їх використання, що призведе до обов'язкових змін у розділах «Ідентифікація А» (Макроскопія) та «Ідентифікація В» (Мікроскопія);
- враховуючи різне фармакологічне використання даного виду ЛРС в Європі та в країнах колишнього СРСР, а також стан хроматографічного обладнання на вітчизняних фітохімічних підприємствах, перспективним є питання розробки спектрофотометричної методики визначення кількісного вмісту БАР буркуну для включення до національної частини відповідної монографії ДФУ.

#### Дослідження сировини

Об'єкти дослідження: надземні частини б. лікарського (зразки **1-5**) і суміші надземних частин б. лікарського та б. високого (зразки **6 і 7**), одержані від різних підприємств із переробки даного виду ЛРС у період 2008-2009 рр.

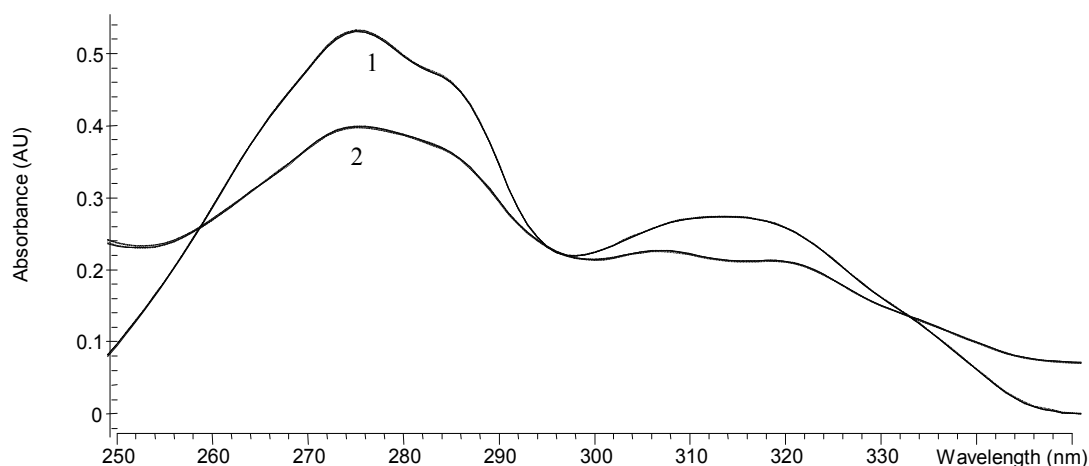
Результати аналізу досліджуваних зразків ЛРС за всіма показниками якості відповідно до вимог ЄФ та ГОСТ 1401-69 наведено в Табл. 4.

**Макроскопічні** дослідження показали, що всі проаналізовані зразки сировини, крім зразка **2** (сировина якого складалась майже виключно зі стебел буркуну), відповідали вимогам ЄФ за морфологічними ознаками. Також було виявлено, що зразки **1** та **3-7** мали дрібноопушену чашечку, на відміну від ознак, наведених у ГОСТ для двох видів буркуну (Табл. 1), тому доречним є введення цієї ознаки до національної частини монографії ДФУ. Крім того, у всіх зразках було виявлено додаткові макроскопічні ознаки а саме: метеликовий віночок: у *M. officinalis* близько 5 мм завдовжки, у *M. altissimus* близько 7 мм завдовжки, біб у *M. officinalis* (2.5-4) мм завдовжки із голою, зморшкуватою поверхнею, біб у *M. altissimus* (4-6) мм завдовжки із притиснуто опушеною, сітчасто зморшкуватою поверхнею. Враховуючи одержані результати, доречним стало введення цих додаткових ознак до національної частини монографії ДФУ на даний вид ЛРС (текст розділу наведено у Табл. 1).

**Мікроскопічні** особливості ЛРС досліджували на подрібненій на порошок сировині та переглядали у хлоральгідрату розчині. Дослідження виявили наступне:

- одна із побічних клітин продигового апарату завжди дрібніша, тому цю ознаку введено до анатомічної характеристики ЛРС у національній частині монографії ДФУ;
- розміри покривних волосків відповідають регламентації, наведеній у монографії ДАС, а їх будова відповідає вимогам як ЄФ, так і ДАС, що також відображено у національній частині монографії ДФУ;
- форма голівки залозистого волоска є мінливою ознакою (від яйцеподібної до булавоподібної); цю ознаку введено до національної частини монографії ДФУ;
- до розділу «Ідентифікація В» національної частини монографії ДФУ «Буркун» введено додаткові, порівняно з ЄФ, мікроскопічні ознаки сировини, що виявлені у всіх проаналізованих зразках, а саме: фрагменти паренхіми, окремі клітини якої містять друзи кальцію оксалату; фрагменти пелюсток із довгастих, більш-менш прямокутних клітин епідерми зі звивистими оболонками та

Рисунок 1



### УФ-спектри поглинання

1 — розчину СЗ кумарину, 2 — розчину, одержаного із наважки сировини буркуну

тонкими спіральними судинами, які також наведено у проекті монографії ЄФ «Melilot» [18].

Текст розділу, розроблений на підставі проведених досліджень та введений до національної частини монографії ДФУ, наведено у Табл. 2.

Як видно із Табл. 4, практично усі зразки не відповідали вимогам НД за вмістом сторонніх домішок. Проте, до національної частини монографії ДФУ було введено вимоги ГОСТ, оскільки відповідно до концепції розробки монографій ДФУ на ЛРС, вимоги статті ГФ XI (а за її відсутності вимоги діючого на території України НД) у будь-якому разі є граничними.

**Ідентифікація С.** При проведенні тесту «Ідентифікація» за методикою ТШХ, описаною в ЄФ,

були використані хроматографічні пластинки Silicagel 60F<sub>254</sub> на скляній і алюмінієвій підкладці (Merck). Було встановлено, що у всіх зразках на хроматограмах чітко виявлялися регламентовані зони: зеленувата флуоресцююча зона на рівні зони *o*-кумарової кислоти, зеленувато-жовта флуоресцююча зона на рівні зони кумарину та блакитна флуоресцююча зона, розташована між зазначеними зонами.

**Кількісне визначення.** Вміст кумарину за методикою ЄФ визначається методом ВЕРХ у таких умовах: колонка розміром 0.25 м × 4 мм, заповнена *силікагелем для хроматографії, октадецилсилільним, ендкепованим Р*, із розміром частинок 5 мкм, довжина хвилі детектування — 275 нм, рухома фаза: *ацетонітрил Р* — розчин

Таблиця 5

### Метрологічні характеристики методики, одержані методом введено-знайдено

Введено кумарину, мкг	Знайдено-кумарину, мкг	Знайдено, у % відносно введеного	Статистичні характеристики
13.66	13.33	97.6	$X_{\text{середнє}} = 100.10$ $S^2 = 1.1232$ $S_r \% = 1.3948$ $\Delta_x = 3.5746$ $\hat{\epsilon} = 3.5711$
27.32	27.99	102.5	
40.98	41.54	101.4	
54.64	54.05	98.9	

Таблиця 6

### Метрологічні характеристики результатів визначення суми кумаринів, у перерахунку на кумарин, одержані при визначенні прецизійності методики

$X_i, \%$	$f$	$\bar{X}_{cp}$	$S$	$S_r$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta_{x,r}$	$\epsilon, \%$
0.79								
0.75	4	0.74	0.0138	0.091	95	3.18	0.0291	3.93
0.73								
0.80								
0.76								

5 г/л фосфорної кислоти P (22:78) зі швидкістю 1.7 мл/хв. Дану методику було відтворено на рідинному хроматографі Waters 2690, фірми «Waters», із діодно-матричним детектором із використанням колонки «Kromasil C 18», розміром 0.25 м × 4.6 мм, розмір частинок 5 мкм.

Результати аналізу досліджуваних зразків сировини щодо кількісного вмісту кумарину представлено в Табл. 4. Як видно із Табл. 4, не всі зразки (а саме, зразки 2, 4, 6) відповідали вимогам ЄФ за вмістом кумарину, але у той же час вони задовольняли вимогам монографії ДАС.

Як було зазначено вище, актуальним є питання розробки спектрофотометричної методики визначення БАР буркуну, що визначають фармакологічну дію препарату.

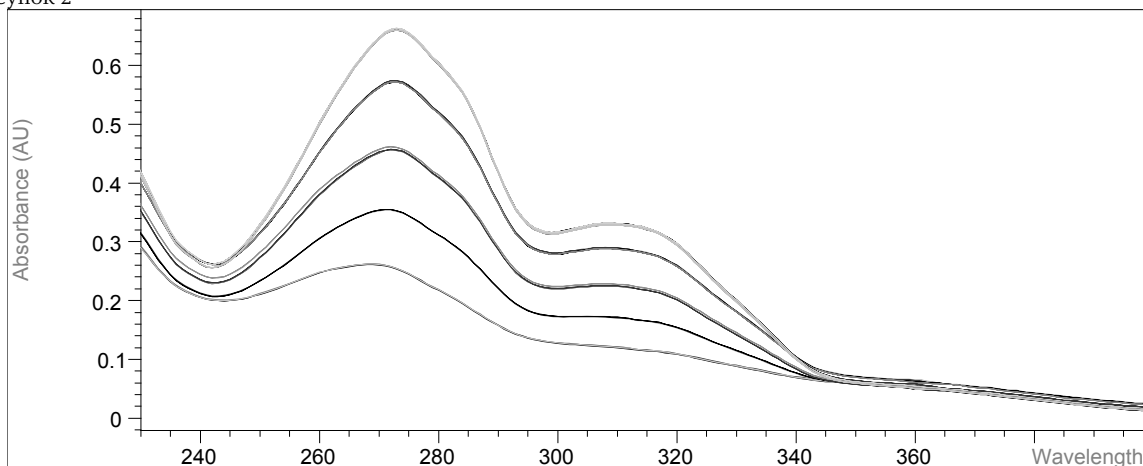
При розробці методики враховували здатність кумаринів екстрагуватися із сировини ліпофіль-

ними розчинниками (хлороформом), оптичну густину отриманих розчинів потім оцінюють спектрофотометричним методом. Визначення вмісту кумаринів проводять з використанням стандартного зразка (СЗ) кумарину.

У першу чергу при розробці методики було перевірено відповідність спектрів поглинання розчину, одержаного із наважки сировини, і спектру поглинання розчину СЗ кумарину, тобто його специфічність

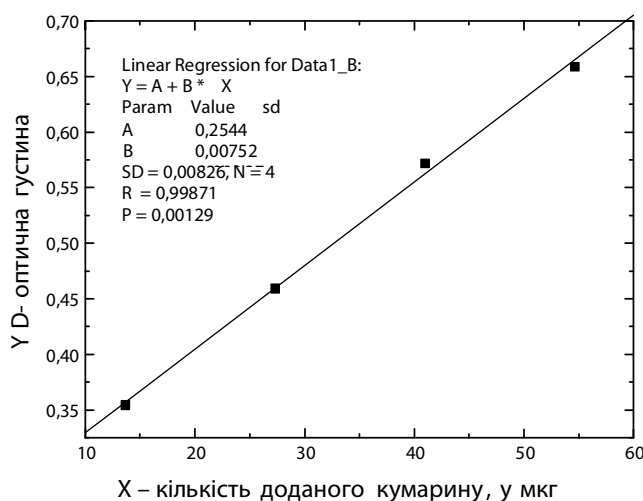
У попередніх дослідженнях було встановлено, що максимум спектра поглинання хлороформного екстракту, одержаного із буркуну, відрізнявся від максимуму спектра поглинання розчину СЗ кумарину на (8-10) нм. Даний факт можна пояснити тим, що відповідно до літературних даних [5] у сировині буркуну, крім кумарину у значній кількості міститься глікозид

Рисунок 2



УФ-спектри поглинання розчинів, одержані при вивченні правильності методики

Рисунок 3



Графік залежності оптичної густини випробовуваних розчинів із доавками кумарину від величини доавок кумарину

о-кумарової кислоти, присутність якого і змінює положення максимуму на спектрі поглинання. Відомо також, що при гідролізі зазначений глікозид перетворюється на кумарин. Тому для вирішення даної проблеми перед екстрагуванням хлороформом наважку сировини піддали кислотному гідролізу із метою переведення всіх кумаринів в агліконову форму. При цьому спектр поглинання випробовуваного розчину, одержаного зазначеним способом, в області від 250 нм до 340 нм мав чітко виражений максимум за довжини хвилі 274 нм  $\pm$  2 нм, що практично співпадало із максимумом поглинання спектра СЗ кумарину (Рис. 1). Таким чином, отримані дані дозволили зробити висновок про можливість визначення вмісту суми кумаринів буркуну, в перерахунку на кумарин, спектрофотометричним методом.

Оскільки загальноприйнятих фармакопейних критеріїв щодо валідації методик кількісного визначення БАР в ЛРС не існує, при вивченні валідаційних параметрів розробленої методики використовували алгоритм, наведений у роботах [17-18]. Після підтвердження специфічності було вивчено такі валідаційні характеристики методики: діапазон застосування (що визначений на підставі аналізу усіх досліджених серій сировини), лінійність, прецизійність, правильність, робастність. У рамках даної роботи наведено результати, одержані при вивченні правильності та прецизійності методики.

Правильність методики перевіряли методом відомих добавок кумарину до випробовуваного розчину буркуну та вимірюванням оптичної густини одержаних розчинів за довжини хвилі 275 нм (УФ-спектри одержаних розчинів наведено на Рис. 2, а графік залежності оптичної густини розчинів від величини добавок кумарину — на Рис. 3). Результати обробки отриманих даних наведено в Табл. 5.

Як видно із наведених даних, в методиці відсутня систематична похибка, відносна невизначеність результатів при довірчій ймовірності 0.95 не перевищує 3.57 %.

Перевірено прецизійність результатів визначення вмісту суми кумаринів в сировині однієї серії паралельно із 5 наважок сировини. Метрологічні характеристики наведено в Табл. 6.

Регламентація вмісту суми кумаринів у сировині буркуну при визначенні спектрофотометричним методом встановлена на рівні не менше 0.6 % на підставі аналізу всіх досліджуваних зразків сировини.

#### Висновки

1. Проведено порівняльний аналіз підходів щодо стандартизації якості сировини буркуну,

наведених у статтях ГФ VIII «Трава донника», ГОСТ 14101-69 «Трава донника», монографіях ЄФ «Melilot» та ДАС «Steinklee». Враховуючи те, що на відміну від ЄФ, в Україні офіційною є сировина двох видів буркуну, а саме *M. officinalis* (L.) Pall. і *M. altissimus* Thuill., показано необхідність при розробці монографії ДФУ введення до національної частини дозволу на використання двох видів, що призведе до обов'язкових змін у розділах «Макроскопія» та «Мікроскопія».

2. На підставі аналізу досліджуваних зразків сировини розроблено розділи «Макроскопія» та «Мікроскопія», що враховують якість сировини, використовуваної в Україні, та які гармонізовані з вимогами провідних Фармакопей.

3. Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику визначення суми кумаринів у сировині буркуну, альтернативну методиці визначення кумарину методом ВЕРХ.

4. На підставі проведених досліджень розроблено проект монографії ДФУ «Буркун» із відповідною національною частиною.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Флора европейской части СССР. - Ленинград: Наука, 1987. - Т. 6. - 254 с.
2. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СРСР) / С.К. Черепанов. - СПб.: Мир и семья, 1995. - 992 с.
3. Определитель высших растений Украины / Добрячаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. - Киев: Наук. думка, 1987. - 348 с.
4. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. - Ленинград: Наука, 1987. - С. 60-161.
5. *Melilotus officinalis* (L.) Lam., herba // Assessment report for the development of community monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof. - London: European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use, 2008. - 38 p.
6. Бубенчикова В.Н. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, И.Л. Дроздова // Хим.-фарм. журнал. - 2004. - Т. 38, № 4. - С. 24-25.
7. Лекарственное растительное сырье:(стандарты). - М.: Издательство стандартов, 1980. - С. 82-85.
8. European Pharmacopoeia. - 7<sup>th</sup> ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2010. - Vol. 2. - 3308 p.
9. Steinklee // Deutschen Arzneimittel-Codex. - Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1999.
10. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України / А.Г. Котов // Фармаком. - 2009. - № 1. - С. 5-19.
11. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину і настоек на її основі до Державної Фармакопеї України / А.Г. Котов // Фармаком. - 2012. - № 3. - С. 31-41.
12. Государственная Фармакопея Союза Советских Социалистических Республик / МЗ СССР. - 8 изд. - М: Медгиз, 1946. - 768 с.

13. Mosyakin S.L. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist / S.L. Mosyakin, M.M. Fedoronchuk // Kiev: M.G. Kholodny Institute of Botany, 1999. — 235 p.
14. Визначник рослин УРСР. - Харків: Комуніст, 1950. — С. 183.
15. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations — Strasbourg: European Directorate for Quality of Medicines, 2007. — 22 p.
16. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 1. / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2011. — № 6 (20). — С. 16–22.
17. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 2. / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2012. — № 1 (21). — С. 4–10.
18. Melilot // Pharmeuropa. — 2010. — Vol. 2, № 3. — P. 291-292.
19. Котова Е.Е. Стандартизація квіток ромашки за кількісним вмістом суми флавоноїдів / Е.Е. Котова // Фармаком. - 2007. - № 3. - С. 17-22.
20. Котова Е.Е. Стандартизація трави материнки за кількісним вмістом флавоноїдів / Е.Е. Котова, Н.І. Тихоненко, А.Г. Котов // Запорізький медичний журнал. - 2011. - № 1. - С. 99-102.

#### Резюме

Котова Э.Э., Котов А.Г., Вовк А.Г.

#### Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Донник»

Проведен сравнительный анализ подходов к стандартизации качества сырья донника. Показана необходимость при разработке монографии ГФУ включения в национальную часть разрешения на использование двух видов донника, а именно *Melilotus officinalis* (L.) Pall. и *Melilotus altissimus* Thuill. На основании анализа исследуемых образцов сырья разработаны разделы «Макроскопия» и «Микроскопия», разработана и валидирована спектрофотометрическая методика определения суммы кумаринов в сырье, разработан

проект монографии ГФУ «Донник» с соответствующей национальной частью.

*Ключевые слова:* Государственная Фармакопея Украины, *Melilotus* Thuill., лекарственное растительное сырье, стандартизация.

#### Summary

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

#### Metter of introduction to the State Pharmacopoeia of Ukraine of monograph «Melilot»

A comparative analysis of approaches to standardization of herbal drug of melilot has been conducted. The necessity to introduce into the national part two species of melilot (*Melilotus officinalis* (L.) Pall. and *Melilotus altissimus* Thuill.) at the development the SPU monograph has been demonstrated. Based on the analysis of samples of herbal drugs have been developed sections «Macroscopy» and «Microscopy», validated spectrophotometric method for the quantification of the content of coumarins in herbal drugs. The SPU draft monograph «Melilot» with relevant national part has been developed.

*Key words:* State Pharmacopoeia of Ukraine, *Melilotus* Thuill., herbal drugs, standardization.

**Котов Андрій Георгійович** (н. 1960). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). К.фарм.н. (1996). Ст. наук. співр. (2004). Керівник наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина» відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

**Котова Еліна Едуардівна.** Закінчила Харківський державний університет (1983). К.фарм.н. (2005). Ст. наук. співр. Заст. керівника відділу «Валідація та стандартні зразки» ДП УНФЦЯЛЗ.

**Вовк Олександра Григорівна.** Закінчила Харківський державний університет (1959). К.б.н. (1969). Доцент (1973). Ст. наук. співр. із напрямку «Лікарська рослинна сировина» відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

## Фітохімічні дослідження

УДК 615.322:543.635.25

Маційчук О.П.

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

### Кількісне визначення полісахаридів листя, насіння, квіток і коренів подорожника великого та подорожника ланцетолистого

Визначено кількісний вміст водорозчинних полісахаридів у листі, квітках, насінні та коренях подорожника великого та подорожника ланцетолистого. Встановлено відмінності у вмісті полісахаридів у лікарській рослинній сировині подорожника великого та подорожника ланцетолистого.

*Ключові слова:* подорожник великий, подорожник ланцетолистий, полісахариди.

Лікарська рослинна сировина (ЛРС) п. великого (*Plantago major* L.) містить полісахариди, слизисті речовини, гіркоти, флаваноїди, дубильні речовини [5] та із давніх часів використовується у медичній практиці [1, 4] в якості ранозагоювальних, протизапальних засобів. ЛРС п. ланцетолистого (*Plantago lanceolata* L. s.l.) містить іридоїди, слизисті речовини, полісахариди, флавоноїди та використовується для лікування захворювань дихальної системи [2].

Із листя *P. major* Горіним А.Г. було виділено комплекс водорозчинних полісахаридів [9]. Цей комплекс речовин пізніше став основою препарату плантаглюциду, що успішно використовується для лікування виразки шлунка.

Samuelsen A.B. в 90 рр. XX століття було виділено 2 полісахариди з високою активністю по відношенню до комплементу: арабіногалактан РМІ та пектиновий полісахарид РМІІ [6].

Вивчення взаємодії людського комплементу і РМІІ показало, що РМІІ являється сильним активатором як класичного, так і альтернативного шляху активації комплементу, викликаючи секрецію людського імуноглобуліну G, що має відношення до відомого ранозагоювального ефекту *P. major*.

Сучасні дослідження з вивчення зв'язку структурної будови та фізіологічної активності полісахаридів, виділених із п. великого, підтверджують, що наявність достатньо довгих бічних ланцюгів із  $\beta$ -1,6-зв'язаних залишків галактози та приєднаних до рамногалактурового кору, є мінімально необхідною вимогою для виявлення комплементактивуєчої дії. Фізіологічна дія підсилюється також у присутності лектинів [7, 8].

Встановлено, що листя п. ланцетолистого містить від 2 % до 6.5 % слизистих полісахаридів. Із листя п. ланцетолистого виділено арабіногалактани, глюкомани та рамногалактурони [2].

На основі одержаних із літератури даних можна зробити висновок, що вивчення складу та структури полісахаридів ЛРС п. великого та п. ланцетолистого, зв'язку між структурою та фізіологічною активністю полісахаридів, а також визначення динаміки накопичення діючих речовин у процесі розвитку рослини є актуальними та перспективними завданнями.

Метою даної роботи є визначення кількісного вмісту полісахаридів в ЛРС п. великого та п. ланцетолистого.

#### *Матеріали та методи*

Об'єктом досліджень було листя, квітки, насіння та корені п. великого та п. ланцетолистого. Рослинну сировину збирали у Київській області.

Кількісне визначення полісахаридів проводили гравіметричним методом [3]. Близько 5 г здрібненої на порошок сировини поміщають у колбу зі скляною притертою пробкою місткістю 250 мл, додають 100 мл води та кип'ятять протягом 30 хв. Потім декантують у мірну колбу місткістю 250 мл, фільтруючи крізь скляну лійку із 5 шарами марлі. Екстрагування продовжують 2 порціями, перша – 100 мл води, друга – 50 мл води, як описано вище. Фільтрують у ту саму мірну колбу. Фільтр промивають водою і доводять об'єм розчину водою до позначки

25 мл одержаного розчину поміщають у центрифужну пробірку, додають 75 мл спирту (96 %), перемішують, нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв, витримують протягом 1 год і центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрують під вакуумом крізь скляний фільтр ПОР16, попередньо висушений при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші вода – спирт (96 %) (1:3) і послідовно промивають 15 мл спирту (96 %), 10 мл ацетону, 10 мл етилацетату. Фільтр з осадом

Таблиця 1

Результати визначення кількісного вмісту полісахаридів у ЛРС подорожника великого та подорожника ланцетололистого

Кількість значень вибірки	$X_i$	$X_{cp}$	$S$	$S_{cp}$	$P$	$t$	Довірчий інтервал	$\varepsilon$
<i>подорожника великого квітки</i>								
5	6.12	6.43	0.29	0.13	0.95	1.96	6.43 ± 0.26	0.26
	6.25							
	6.56							
	6.87							
	6.36							
<i>подорожника ланцетололистого квітки</i>								
5	6.12	5.74	0.23	0.10	0.95	1.96	5.74 ± 0.20	0.20
	5.65							
	5.55							
	5.79							
	5.59							
<i>подорожника ланцетололистого листя</i>								
5	6.99	6.82	0.32	0.14	0.95	1.96	6.82 ± 0.28	0.28
	6.87							
	6.52							
	7.22							
	6.48							
<i>подорожника великого листя</i>								
5	16.65	16.89	0.35	0.15	0.95	1.96	16.89 ± 0.30	0.30
	17.30							
	16.87							
	17.14							
	16.46							
<i>подорожника великого корені</i>								
5	4.73	4.61	0.29	0.13	0.95	1.96	4.61 ± 0.26	0.26
	5.06							
	4.46							
	4.39							
	4.38							
<i>подорожника ланцетололистого корені</i>								
5	3.11	3.20	0.15	0.07	0.95	1.96	3.20 ± 0.13	0.13
	3.21							
	3.01							
	3.41							
	3.27							
<i>подорожника ланцетололистого насіння</i>								
5	5.89	5.30	0.38	0.17	0.95	1.96	5.30 ± 0.33	0.33
	5.11							
	5.39							
	5.19							
	4.89							
<i>подорожника великого насіння</i>								
5	7.29	6.96	0.23	0.10	0.95	1.96	6.96 ± 0.20	0.20
	7.05							
	6.90							
	6.88							
	6.68							

сушать на повітрі, потім висушують до постійної маси при температурі від 100 °С до 105 °С і зважують.

#### Результати досліджень та їх обговорення

Вміст полісахаридів, у перерахунку на суху сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{(m_2 - m_1) \times 100000}{m \times (100 - W)},$$

де:

$m$  — маса наважки випробуваної сировини, у грамах,

$m_1$  — маса фільтра, у грамах,

$m_2$  — маса фільтра із залишком, у грамах,

$W$  — втрата в масі при висушуванні сировини, у відсотках.

Результати вивчення кількісного вмісту полісахаридів листя, квіток, насіння та коренів п. великого та п. ланцетолистого наведено в Табл. 1.

Порівняльні дані кількісного вмісту полісахаридів у ЛРС п. великого та п. ланцетолистого наведено на Рис. 1.

Встановлено, що в найбільшій кількості полісахариди містяться у листі (16.89 %) і насінні (6.96 %) п. великого.

У меншій кількості полісахариди містяться у листі п. ланцетолистого — 6.82 % та квітках п. великого — 6.43 %.

Насіння та квітки п. ланцетолистого містять 5.3 % і 5.74 % полісахаридів, відповідно.

У коренях п. великого встановлено кількісний вміст полісахаридів на рівні 4.61 %, у коренях п. ланцетолистого — 3.20 %.

Таким чином, встановлено відмінності у кількісному вмісті полісахаридів у різних органах двох видів ЛРС — п. великого та п. ланцетолистого.

#### Висновки

1. Проведено кількісне визначення водорозчинних полісахаридів у листі, насінні, квітках та коренях п. великого та п. ланцетолистого.

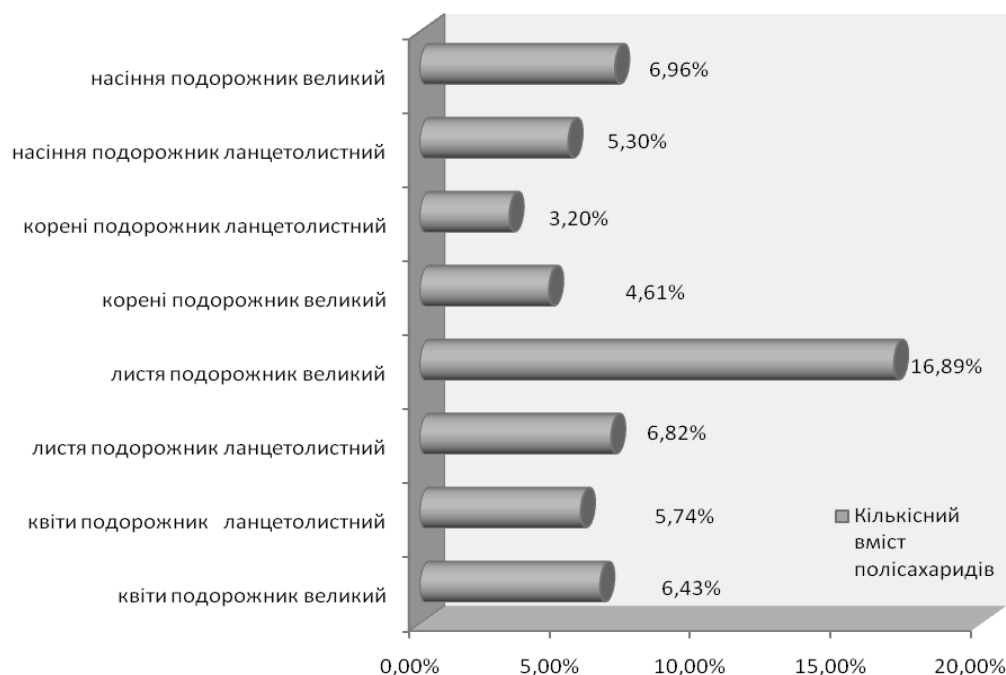
2. Встановлено, що у найбільшій кількості водорозчинні полісахариди містяться у листі — 16.89 % та насінні — 6.96 % п. великого.

3. На основі проведеного дослідження можна зробити висновок про відмінність у кількісному вмісті полісахаридів у ЛРС п. великого та п. ланцетолистого.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Оленников Д.Н. Подорожник большой. Химический состав и применение / Д.Н. Оленников, А.В. Samuelsen, Л.М. Танахаева // Химия растительного сырья. — 2007. — № 2. — С. 37-50.
2. Assessment report on *Plantago lanceolata* L., folium. — European Medicines Agency, 2010. — 25 p.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». - 1-е вид. - Доповнення 3. - Харків:

Рисунок 1



Кількісний вміст полісахаридів у листі, квітках, насінні та коренях подорожника великого та подорожника ланцетолистого



- Державне підприємство «Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів», 2009. - 280 с.
4. Mohamed I. Kobeasy. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyatopsis tetragonoloba* L. / Mohamed I. Kobeasy, M. Osama // International Journal of Biodiversity and Conservation. - 2011. - Vol. 3, № 3. - P. 83-91.
5. Samuelsen A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major*. A review / A.B. Samuelsen // Journal of Ethnopharmacology. - 2000. - Vol. 71. - P. 1-21.
6. Samuelsen A.B. Isolation and Partial Characterization of Biologically Active Polysaccharides from *Plantago major* L. / A.B. Samuelsen, B.S. Paulsen, J.K. Wold, H. Otsuka, H. Yamada, T. Espevik // Phytotherapy Research. - 1995. - Vol. 9. - P. 211-218.
7. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность / Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия. - 1998. - Т. 24, № 7. - С. 483-501.
8. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия. - 2009. - Т. 35, № 3 - С. 293-310.
9. Горин А.Г. Химическое исследование полисахаридов листьев *Plantago major* L. 1. Анализ моносахаридного состава полисахаридного комплекса / А.Г. Горин // Химия природных соединений. - 1965. - № 5. - С. 297 – 302.

Резюме  
Маційчук А.П.

**Количественное определение полисахаридов листьев, цветков, семян и корней подорожника большого и подорожника ланцетолистного**

Определено количественное содержание водорастворимых полисахаридов в листьях, цветках, семенах и корнях подорожника большого и подорожника ланцетолистного. Установлены различия в содержании полисахаридов в ЛРС подорожника большого и подорожника ланцетолистного.

**Ключевые слова:** подорожник большой, подорожник ланцетолистный, полисахариды.

Summary  
Macychuk A.P.

**Quantitative determination of polysaccharides of leaves, seeds, flowers and roots of *Plantago major* L. and *Plantago lanceolata* L.**

The quantitative content of water-soluble polysaccharides in leaves, flowers, seeds and roots of *Plantago major* L. and *Plantago lanceolata* L. Differences in the content of in *Plantago major* L. and *Plantago lanceolata* L. have been determined.

**Key words:** *Plantago major* L., *Plantago lanceolata* L., polysaccharides.

**Маційчук Олександра Петрівна.** Магістр фармації. Експерт групи моніторингу побічних реакцій ДЕЦ МОЗ України. Аспірант кафедри фармакогнозії та ботаніки НМУ ім. О.О. Богомольця.

УДК 615. 322 : 582. 998.1 - 035.85]. 074

Єренко О.К., Мазулін О.В., Буряк В.П., Мазулін Г.В.  
Запорізький державний медичний університет

**Амінокислотний склад трави та ліофільного екстракту *Inula helenium* L.**

У траві та ліофільному екстракті *Inula helenium* L. методом високоефективної рідинної хроматографії встановлено наявність 17 амінокислот, 7 із яких є незамінними. Найбільший вміст зв'язаних у складі рослинного білка та вільних амінокислот було визначено у ліофільному екстракті трави *Inula helenium*: до (13.59±1.32) % та (2.00±0.18) %, відповідно. Трава *Inula helenium* перспективна для одержання водорозчинних фітопрепаратів протизапальної та гепатозахисної дії.

**Ключові слова:** *Inula helenium* L., ліофільний екстракт, амінокислоти, метод високоефективної рідинної хроматографії.

Рід оман (*Inula* L.) родини айстрові (*Asteraceae*) налічує понад 200 видів, в Україні зростає понад 11 видів омани [9]. Значний практичний інтерес для медицини має оман високий (*Inula helenium* L.) (соняшник дикий, дивосил, дев'ятисил, галаган), який зареєстровано як офіційна рослина в Україні, країнах СНД, Західній Європі, Середземномор'ї, Азії, Африці та ін. [2, 5, 6].

О. високий росте по берегах річок, на лісових і заплавахних луках, у розріджених заплавах лісах. Рослина розповсюджена майже по всій Україні, частіше у Лісостепу. Рослина успішно культивується у країнах Західної, Східної та Північної Європи, Північної Америки, Малої та Середньої Азії, Близького Сходу, Середземномор'я, Північної Африки, Казахстані та Росії [5, 6, 9, 13].

*I. helenium* - багаторічна трав'яниста рослина, висотою до 2 м, із міцними прямостоячими стеблами та товстим темно-бурим м'ясистим кореневищем. Кореневища та корені мають своєрідний ароматний запах. Стебло борозенчасте, у верхній частині розгалужене, внизу розсіяно, вгорі - густо опушене жорсткими волосками. Листки чергові, до 50 см завдовжки та до 25 см завширшки, зверху зелені, голі, знизу - сірі, повстисті, з серцеподібною півстеблообгортною основою, нерівномірно зубчасто пилчастими краями, нижні - черешкові, довгасто еліптичні, розеткові листки - черешкові. Суцвіття кошики (6-8) см у діаметрі, нечисленні, багатоквіткові, на товстих квітконосах, поодинокі або утворюють на верхівці щиткоподібне суцвіття. Обгортка півкуляста, багаторядна, складається

із зелених, ланцетних листочків. Квітколоже голе, плоске або дещо опукле. Квітки жовті, крайові квітки язичкові - жіночі, однорядні, із вузько лінійним тризубчастим відгином, вдвічі довші за обгортку; серединні - багаторядні, двостатеві, трубчасті. Вони мають п'ять тичинок, маточку зі стовпчиком із дволопатевою приймочкою та нижньою зав'яззю. Плід - лінійно-довгаста чотиригранна сім'янка (1.0-3.5) см завдовжки, коротко волосиста, із однорядним чубком бруднувато-білих зазубрених волосків завдовжки (4-9) мм.

Цвіте у липні - вересні, плодоносить у серпні - жовтні [6, 7, 9, 13].

Як ЛРС *I. helenium* звичайно використовують кореневища з коренями, що заготовляють восени та рано навесні [6, 7, 11]. Вони містять інулін (до 44 %), інуленіл та інші полісахариди, слиз, смоли, камеді, гіркоти, слідові кількості алкалоїдів, сапоніни, органічні кислоти, ефірну олію (до 3 %), у складі якої наявні біциклічні сесквітерпенові лактони (алантолактон, ізоалантолактон, дигідроалантолактон, 2-оксоалантолактон, 1 $\beta$ -гідроксиалантолактон, асперилін, 4*H*-конфертин, костунолід, гермакрен - D-лактон, проазулен),  $\alpha$ -токоферол, пігменти.

Хімічний склад трави досліджено недостатньо. Встановлено наявність у сировині флавоноїдів, лактону алантопікрину, вітаміну С, органічних кислот, неорганічних елементів [1, 4, 5, 6, 8].

Застосовують відвар кореневищ із коренями (1:10) для збудження апетиту, покращення травлення (особливо при зниженій кислотності), регулювання секреторної функції шлунка та кишечника, стимулювання загального обміну речовин. Він виявляє також сечогінну, жовчогінну, потогінну, протиглисну, відхаркувальну, антисептичну, протизапальну та заспокійливу дію. Екстракти з ЛРС *I. helenium* використовують у сучасній медицині у складі комплексних фітопрепаратів: «Бальзам Біттнера» («Richard Bittner AG», Австрія), «Доктор Мом рослинний сироп від кашлю» («Юнік Фармасьютикал Лабораторіз», Індія), «Депурафлукс» («Рон-Пуленк Рорер», Німеччина), «Кім лонг» («Baо Long», В'єтнам), «Сік лонг» («Baо Long», В'єтнам), «Тонзилгон Н» («Ноймаркт», Німеччина), «Урофлукс» («Rhone-Poulenc Rorer», Франція), «Пектосол» (ВАТ «Фармак», Україна), «Бронховітол» («Контракт», Україна) «Алантон» (ЗАТ «Віфітех», Росія) [4, 7, 11, 14].

Найважливішими біологічно активними речовинами, що синтезують рослини, є амінокислоти як вільні, так і у складі рослинного білка [3, 4, 12, 14].

Амінокислоти у медицині широко застосовують для парентерального введення, лікування захворювань органів травної системи, печінки, анемії, опіків, виразок шлунка, нервово-психічних й епілептичних нападів, фармако-

Таблиця

Вміст амінокислот у траві та ліофільному екстракті *Inula helenium* (червень - липень 2011 р., с. Підstepне, Херсонська область), мг / 100 мг ( $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ ),  $\mu = 6$

Назва амінокислоти	Трава		Ліофільний екстракт	
	зв'язані амінокислоти	вільні амінокислоти	зв'язані амінокислоти	вільні амінокислоти
аспарагінова кислота	0.33±0.03	0.02±0.001	0.22±0.02	0.04±0.003
треонін	0.37±0.04	0.09±0.007	1.02±0.10	0.03±0.005
серін	0.13±0.01	0.02±0.001	0.82±0.08	0.03±0.001
глутамінова кислота	0.23±0.02	0.02±0.001	—	—
пролін	0.06±0.01	0.01±0.001	—	—
цистин	0.12±0.01	0.05±0.010	3.68±0.35	0.40±0.020
гліцин	0.42±0.04	0.15±0.013	0.55±0.06	0.07±0.006
аланін	1.05±0.11	0.14±0.011	1.46±0.15	0.22±0.011
валін	0.19±0.02	0.09±0.010	0.56±0.06	0.07±0.005
метіонін	0.67±0.07	0.06±0.010	0.20±0.02	0.03±0.003
ізолейцин	0.38±0.04	0.37±0.032	0.45±0.04	0.42±0.011
лейцин	2.34±0.21	0.15±0.013	0.91±0.09	0.13±0.012
тирозин	0.95±0.08	0.06±0.001	0.45±0.05	0.05±0.005
фенілаланін	0.41±0.04	0.06±0.001	0.47±0.05	0.07±0.006
гістидин	0.47±0.05	0.04±0.001	0.23±0.02	0.09±0.008
лізин	1.21±0.11	0.19±0.017	1.36±0.14	0.13±0.012
аргінін	1.08±0.10	0.17±0.100	1.21±0.11	0.16±0.014
сумарний вміст амінокислот	10.54±1.00	1.69±0.150	13.59±1.32	2.00±0.180

логічної корекції порушень органів гепатобіліарної системи [7, 12].

Визначення складу та вмісту амінокислот у лікарській рослинній сировині та фітопрепаратах має великий науковий і практичний інтерес.

Метою даної роботи є вивчення вмісту амінокислот трави та ліофільного екстракту *Inula helenium* L. для одержання комплексних фітопрепаратів протизапальної та гепатозахисної дії.

#### Експериментальна частина

Рослинну сировину (облистяні верхівки пагонів із суцвіттями до 30 см завдовжки) заготовлено у різних регіонах України у 2011 році у період цвітіння (червень - липень).

Ліофільний екстракт одержано методом сублімаційного сушіння водного витягу (1:10) в установці КС-30 («Фрігера», Чехія). Водні витяги готували із трави (1:10). По 200 мл одержаного витягу поміщали у скляні флакони місткістю 500 мл та заморожували у спиртовій ванні при температурі  $-40^{\circ}\text{C}$  протягом 1 год, постійно обертаючи навколо осі. Після закінчення технологічного процесу заморожування флакони ретельно очищали від спирту та переносили до холодильника (із температурою  $-30^{\circ}\text{C}$ ) для "загартування" (протягом 12 год). До початку сублімаційної сушки робочі частини субліматора та касети ретельно обробляли етанолом (96 %). Касети охолоджували (при температурі  $-30^{\circ}\text{C}$ ) і заповнювали відкоркованими флаконами із замороженими витягами. У субліматорі доводили тиск до  $(60 \pm 10)$  Па при одночасному зниженні температури до  $(-25 - -50)^{\circ}\text{C}$ . Через 3 год температура витягу не має бути нижчою  $-25^{\circ}\text{C}$ . Потім поступово підвищували температуру підігріву касет до  $40^{\circ}\text{C}$ . Загальна тривалість процесу складала до 30 год. Флакони з одержаним ліофільним екстрактом відразу закривали гумовими пробками, закупорювали алюмінієвими ковпачками та заливали металеком.

Одержані субстанції являли собою пухкі аморфні маси світло-зеленого кольору із характерним смаком і запахом.

Вихід ліофільного екстракту з 1 л водного витягу трави *I. helenium* (1:10) становив  $(30.88 \pm 3.02)$  %, вміст вологи —  $(3.90 \pm 0.39)$  %.

Для підтвердження якісного та визначення кількісного складу біологічно активних зв'язаних у складі білка, а також вільних амінокислот використовували методику, запропоновану Штейном і Муром. Дослідження проводили на вискоэффективному рідинному хроматографі моделі ААА 881 (Чехія) з використанням стандартних зразків [14].

Для визначення зв'язаних у складі білка амінокислот близько 0,1 г (точну наважку) здрібненої сировини піддавали кислотному гідролізу 6 М розчином хлористоводневої кислоти на водяній бані при температурі  $50^{\circ}\text{C}$  протягом 24 год, сухий залишок розчиняли у цитратному буферному розчині (рН 2.2). Розчин вводили у колонки розміром 0.8 см  $\times$  60 см (№ 1) і 0.7 см  $\times$  60 см (№ 2), заповнені катіонітом марки Ostion LGAN. Як елюенти використовували цитратні буферні розчини (рН 3.25; 4.25; 5.28) під робочим тиском  $(14-16)$  кПа/см<sup>2</sup> (колонка № 1) і  $(4-8)$  кПа/см<sup>2</sup> (колонка № 2).

Вільні амінокислоти визначали без попереднього гідролізу білкових сполук.

#### Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень наведено у Таблиці. Одержані дані вказують на вміст у траві *Inula helenium* та ліофільному екстракті з неї 17 амінокислот (вільних та у складі білка), 7 із яких (лейцин, ізолейцин, метіонін, лізин, треонін, фенілаланін, валін) є незамінними.

Результати досліджень свідчать про високу концентрацію зв'язаних у складі білка амінокислот (ізолейцину, лізину, аланіну, лейцину, аргініну) як у траві, так і у ліофільному екстракті. Вміст найбільш суттєвих компонентів у траві становив: лейцину -  $(2.34 \pm 0.21)$  %, лізину —  $(1.21 \pm 0.11)$  %, аргініну —  $(1.08 \pm 0.10)$  %, аланіну —  $(1.05 \pm 0.11)$  %, тирозину —  $(0.95 \pm 0.08)$  %. Вміст зв'язаних у складі білка амінокислот у ліофільному екстракті був суттєво більшим і становив: цистину -  $(3.68 \pm 0.35)$  %, аланіну —  $(1.46 \pm 0.15)$  %, лізину —  $(1.36 \pm 0.14)$  %, аргініну —  $(1.21 \pm 0.11)$  %, треоніну —  $(1.02 \pm 0.10)$  %.

Загальний вміст вільних амінокислот у траві і ліофільному екстракті був практично однаковим та становив  $(2.00 \pm 0.16)$  %. Невисокий рівень вмісту проліну в ЛРС узгоджується із даними, наведеними в [14].

Проведені дослідження свідчать про перспективність використання трави *Inula helenium* для одержання комплексних ліофільних фітопрепаратів протизапальної та гепатозахисної дії.

#### Висновки

1. Вивчено якісний склад та вміст зв'язаних у складі білка та вільних амінокислот у траві та ліофільному екстракті *Inula helenium* L.

2. Встановлено наявність 17 амінокислот, 7 із яких є незамінними.

3. Значний вміст амінокислот у траві та ліофільному екстракті досліджуваної ЛРС дозволяє рекомендувати *I. helenium* як перспективне джерело для одержання комплексних фітопрепаратів протизапальної та гепатозахисної дії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Багаутдинова Р.И. Фруктосодержащие углеводы растительного семейства - локализация и состав / Р.И. Багаутдинова, Г.П. Федосеева, Т.Ф. Околешникова // Химия и компьютерное моделирование. Бултеровские сообщения. - 2001. - № 5. - С. 13-16.
2. Биологически активные вещества антиязвенного растительного средства «Вентрофит» / П.Б. Лубсандоржаева, Т.А. Ажунова, Л.Н. Шанталова [и др.] // Химия раст. сырья. - 2006. - № 1. - С. 59 - 64.
3. Володимирець В.І. Біохімія рослин: Інтеративний комплекс навчально-методичного забезпечення / В.В. Володимирець. - Рівно: НУВГП. - 2006. - 127 с.
4. Клочков С.Г. Изучение сесквитерпеновых лактонов растений рода *Inula* L. как основы для разработки новых антинеопластов с проапоптотическим действием / С.Г. Клочков, С.В. Афанасьева, И.С. Зефирова // Технология жировых систем. - 2008. - № 5-6. - С. 120-125.
5. Кобзар А.Я. Фармакогнозія в медицині: навч. посіб. / А.Я. Кобзар. - К. : Медицина, 2007. - 543 с.
6. Лікарські рослини: Енциклопедичний довід. / За ред. А.М. Гродзінського. - К.: Українська енциклопедія, 1992. - 543 с.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - 14-е изд., перераб. и доп. / М.Д. Машковский - М.: ООО "Издательство Новая волна", 2002. - Т. 1. - 540 с.
8. Методика количественного определения суммарного содержания полифруктанов в корневищах и корнях девясила высокого (*Inula helenium* L.) / Д.И. Оленников, Н.М. Талхаева, Г.В. Чехиров, Е.В. Петров // Химия раст. сырья. - 2008. - № 1. - С. 95-99.
9. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева, М.И. Котов, Ю.Н. Прокудин и др. / Под ред. Ю.Н. Прокудина. - К.: Наук. думка, 1987. - 548 с.
10. Палов М. Энциклопедия лекарственных растений / М. Палов: Пер. с нем., предисл. И.А. Губанова - М.: Мир, 1998. - 468 с.
11. Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства / Под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. - М.: ГЭОТАР – МЕД, 2002. - 288 с.
12. Филипцова Г.Г. Основы биохимии растений / Г.Г. Филипцова, И.И. Смолин. - Минск: БГУ. - 2004. - 136 с.
13. Цвелев Н.Н. Определитель сосудистых растений Северо-Западной России. - СПб: Изд. во СПУВА, 2000. - 781 с.
14. Preparation of dried extract from *Inula helenium* L. roots and characterization of its chemical content / G.L. Ryzhova, S.A. Matasova, N.A. Mitina, D.O. Zhuganov, K.A. Dychko. - Chemistry of plant raw materials. - 1999. - Vol. 3. - № 2. - P. 119-123.

## Резюме

Еренко Е.К., Мазулин А.В., Буряк В.П., Мазулин Г.В.

**Аминокислотный состав травы и лиофильного экстракта *Inula helenium* L.**

В траве и лиофильном экстракте *Inula helenium* L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено наличие 17 аминокислот, 7 из которых являются незаменимыми. Наибольшее содержание связанных в составе растительного белка и свободных аминокислот установлено в лиофильном экстракте травы растения: (13.59±1.32) % и (2.00±0.18) %, соответственно. Травя *Inula helenium* перспективна для получения водорастворимых фитопрепаратов противовоспалительного и гепатопротективного действия.

**Ключові слова:** *Inula helenium* L., лиофильный экстракт, аминокислоты, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## Summary

Yerenko D.C., Mazulin O.V., Buryak V.P., Mazulin G.V.

**Amino acid composition of herb and lyophilic extract of *Inula helenium* L.**

By HPLC in the herb and lyophilic extract of *Inula helenium* L. has been established the presence of up to 17 amino acids, 7 of which were essential. The largest content of plant protein and free amino acids were determined in *I. helenium* lyophilic extract (to 13.59 ± 1.32 per cent and 2.00 ± 0.18 per cent, respectively). *I. helenium* herb has been found to be promising for obtaining of soluble herbal drugs with anti-inflammatory and hepatoprotective effects.

**Key word:** *Inula helenium* L., lyophilic extract, amino acids, high performance liquid chromatography.

**Єренко Олена Костянтинівна.** Асистент (2011) кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету.

**Мазулін Олександр Владиленич.** Д.фарм.н. (1994). Професор (2008). Зав. кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету.

**Буряк Валерій Прокопович.** Д.фарм.н. (1990). Професор (1992). Професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету.

**Мазулін Георгій Владиленич.** К.фарм.н. (2004). Асистент кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету.

УДК 543.51 : 577.115.3 : 581.46

Сидора Н.В.

Національний фармацевтичний університет

## Хромато-мас-спектрометричне дослідження летких сполук квіток глодів представників секції *Oxyacanthae* Loud.

Хромато-мас-спектрометричним методом проведено порівняльне дослідження летких сполук квіток *Crataegus subrotunda* Klok. та *Crataegus turkestanica* A. Pojark. секції *Oxyacanthae* Loud. Визначено вміст терпеноїдів у квітках, що від загальної суми сполук становив для *C. subrotunda* Klok. – 9.3%; *C. turkestanica* A. Pojark. – 20.02%. Домінуючими терпеноїдними сполуками для *C. subrotunda* Klok. є сквален (84.7%) та  $\alpha$ -терпінеол (9.5%); *C. turkestanica* A. Pojark. – ліналоол (27.2%), сквален (20.3%),  $\alpha$ -терпінеол (17.2%) та гераніол (9.5%).

**Ключові слова:** хромато-мас-спектрометричний метод, леткі сполуки, *Crataegus subrotunda* Klok., *Crataegus turkestanica* A. Pojark.

Фітохімічне дослідження нефармакопейних рослин - представників великих родів - є актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки. Таким родом є рід Глід (*Crataegus* L.), що нараховує понад 1500 видів та за морфологічними ознаками поділяється на 25 ботанічних секцій [2, 4]. Фармакопейною сировиною є плоди, квітки та листя глодів [3]. Препарати на основі цієї сировини використовуються як серцево-судинні засоби [8]. У квітках глодів досліджувались переважно фенольні сполуки — флавоноїди, гідроксикоричні кислоти. Науковий інтерес представляє подальше дослідження інших сполук із метою комплексного вивчення біологічно активних речовин (БАР) сировини. Нами було досліджено БАР ліпофільних сполук квіток глодів представників секцій *Tenuifoliae* Sarg., *Molles* Sarg. і *Coccineae* Loud. [5, 6].

Метою даної роботи є хромато-мас-спектрометричне дослідження летких сполук квіток глоду заокругленого (*C. subrotunda* Klok.) та глоду туркестанського (*C. turkestanica* A. Pojark.), що належать до секції *Oxyacanthae* Loud., для використання одержаних даних при проведенні хемотаксономічного дослідження роду *Crataegus* L.

### Експериментальна частина

Об'єктами дослідження стали квітки *C. subrotunda* Klok. та *C. turkestanica* A. Pojark., заготовлені у травні 2011 року на території ботанічного саду Національного університету ім. В.Н. Каразіна. Ідентифікацію досліджуваних видів проводили при консультативній допомозі старшого наукового співробітника В.І. Шатровської. Для дослідження використовували повітряно-суху сировину.

Якісний склад і кількісний вміст летких сполук квіток визначали хромато-мас-спектрометричним методом [1, 7]. Наважку ((0,5-5) г) сировини поміщали у віалу місткістю 20 мл та додавали внутрішній стандарт (тридекан), із подальшим використанням одержаної концентрації внутрішнього стандарту для розрахунків. Дослідження

проводили на хроматографі Agilent Technology HP6890 GC із мас-спектрометричним детектором 5973N. Умови хроматографування: хроматографічна колонка кварцова, капілярна HP-5MS, розміром 30 м × 0.25 мм. Газ-носієй — гелій. Швидкість потоку газу-носія 1 мл/хв. Об'єм проби — 2 мкл. Введення проби без розділення потоку. Швидкість введення проби 1.2 мл/хв протягом 0.2 хв. Температура термостату 50 °С із програмуванням 4 °/хв до температури 220 °С. Температура детектора та випарника 250 °С.

### Результати досліджень та їх обговорення

Одержані спектри розглядали як на основі загальних закономірностей фрагментації молекул органічних сполук під дією електронного удару, так і порівнянням результатів із даними мас-спектральної бібліотеки NIST05 та WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів понад 470000 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST.

У квітках *C. subrotunda* виявлено 33 сполуки, 24 з яких ідентифіковано; у квітках *C. turkestanica* — 78 сполук, 51 з яких ідентифіковано. Хроматограми летких сполук квіток *C. subrotunda* та *C. turkestanica* наведено на Рис. 1, 2.

Результати хромато-мас-спектрометричного дослідження квіток глодів наведено у Таблиці.

Як видно з Таблиці, у досліджуваних видах ідентифіковано 54 сполуки різної хімічної природи: ароматичні сполуки - бензальдегід, 4-метоксибензальдегід; терпеноїди -  $\alpha$ -терпінеол, лімонен, 1,8-цинеол, ліналоол, цис-ліналоол оксид, транс-ліналоол оксид, гераніол, геранілацетон, сквален, нерол, гексагідрофарнезиллацетон, каріофіленоксид; похідні амінокислот - метилові ефіри валіну та ізолейцину; вищі вуглеводні, альдегіди та спирти.

У квітках *C. subrotunda* ідентифіковано терпени та терпеноїди, а також вищі вуглеводні, альдегіди, спирти. Вміст терпеноїдів складає 9.3% від загального вмісту сполук. Серед терпе-

ноїдів за кількісним вмістом (від суми терпеноїдів) домінують сквален (84.7 %) та  $\alpha$ -терпінеол (9.5 %).

У квітках *C. turkestanica* ідентифіковано ароматичні сполуки, терпеноїди, похідні амінокислот, вищі вуглеводні, альдегіди та спирти. Вміст терпеноїдів становить 20.02 %, ароматичних сполук – 0.66 % від загального вмісту сполук. Серед терпеноїдів за кількісним вмістом домінують ліналоол (27.2 %), сквален (20.3 %),  $\alpha$ -терпінеол (17.2 %) та гераніол (9.5 %).

Загальними сполуками для квіток *C. subrotunda* та *C. turkestanica* є терпеноїди цис-ліналоол оксид, ліналоол,  $\alpha$ -терпінеол і ряд вуглеводнів.

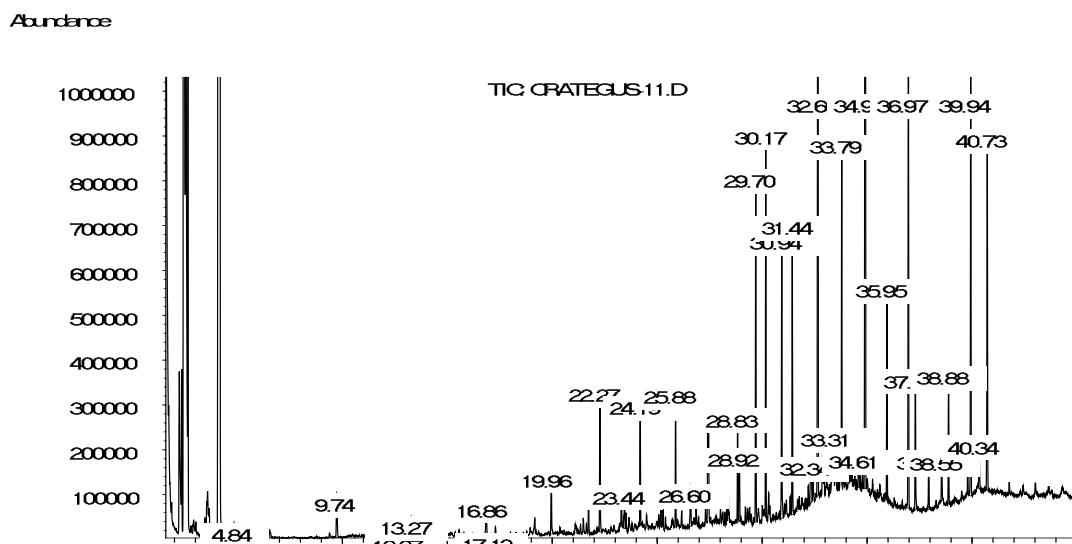
#### Висновки

1. Вперше проведено порівняльне хромато-мас-спектрометричне дослідження летких сполук *C. subrotunda* Klok. та *C. turkestanica* A. Pojark. секції *Oxyacanthae* Loud.

2. У квітках *C. subrotunda* виявлено 33 сполуки, 24 з яких ідентифіковано; у квітках *C. turkestanica* – 78 сполук, 51 з яких ідентифіковано.

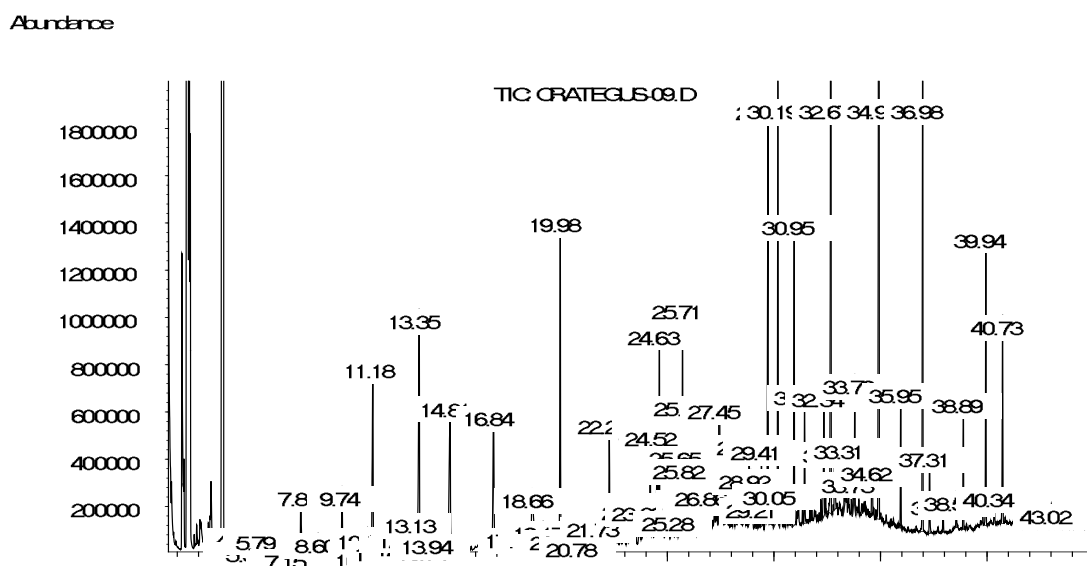
3. Визначено терпеноїдний вміст квіток, який від загальної суми компонентів становив для *C. subrotunda* – 9.3 %; *C. turkestanica* A. – 20.02 %.

Рисунок 1



Хроматограма летких сполук квіток *C. subrotunda* Klok.

Рисунок 2



Хроматограма летких сполук квіток *C. turkestanica* A. Pojark.

Таблиця

Ідентифіковані леткі сполуки квіток глодів

№	Назва сполуки	<i>C. subrotunda</i> Klok.		<i>C. turkestanica</i> A. Pojark.	
		Час утримування	Кількісний вміст (мг/кг)	Час утримування	Кількісний вміст (мг/кг)
1.	2-гексеналь	4.83	11.4	4.84	2.4
2.	2-гептеналь			5.36	1.3
3.	гексанол			5.78	7.1
4.	2-гексен-1-ол ацетат			6.85	0.1
5.	2,5-диметилпіразин			7.01	0.3
6.	2,3-диметилпіразин			7.15	0.3
7.	метиловий ефір валіну			7.8	8.7
8.	бензальдегід			8.59	3.0
9.	декан			9.73	7.2
10.	лімонен			10.81	0.3
11.	1,8-цинеол			10.95	2.5
12.	метиловий ефір ізолеїцину			11.17	25.9
13.	транс-ліналоол оксид			12.29	2.8
14.	2, 3, 5, 6-тетраметилпіразин			12.75	1.8
15.	цис-ліналоол оксид	12.86	2.0	12.87	2.4
16.	2-метилоктанол-3			13.12	6.0
17.	ліналоол	13.27	14.0	13.35	35.5
18.	2,6-диметилциклогексанол			13.74	1.6
19.	β-фенілетиловий спирт			13.94	5.8
20.	бензонітрил			14.8	29.0
21.	α-терпінеол	16.85	26.0	16.84	22.4
22.	деканаль	17.12	3.0		
23.	нерол			17.87	4.1
24.	гераніол			18.65	12.5
25.	4-метоксибензальдегід			18.84	1.3
26.	2-феніл-2-бутеналь			19.17	2.8
27.	2-фенілнітроетан			20.04	1.7
28.	2-метокси-4-вінілфенол			20.77	1.2
29.	2, 6, 10-триметилдодекан			21.73	2.9
30.	тетрадекан	22.27	70.6	22.27	10.8
31.	геранілацетон			23.23	3.7
32.	2,6,10,14-тетраметилдекан	23.44	23.6	23.44	4.3
33.	β-іонон			23.88	4.2
34.	пентадекан	24.19	55.9	24.19	9.5
35.	каріофіленоксид			25.82	4.3
36.	гексадекан	25.87	59.4	25.88	9.5
37.	гептадекан	27.41	29.4	27.42	9.9
38.	пристан			27.44	12.2
39.	октадекан	28.83	44.9		
40.	гексагідрофарнезиллацетон			29.41	7.8
41.	нонадекан	30.17	157.0	30.18	38.8
42.	ейкозан	31.43	124.4		
43.	хенейкозен-1	32.33	39.8	32.34	15.4
44.	хенейкозан	32.66	499.6	32.67	83.8
45.	фітол			32.84	8.8
46.	докозан	33.79	148.9	33.79	10.1

Таблиця (продовження)

№	Назва сполуки	<i>C. subrotunda</i> Klok.		<i>C. turkestanica</i> A. Pojark.	
		Час утримування	Кількісний вміст (мг/кг)	Час утримування	Кількісний вміст (мг/кг)
47.	трикозен-1	34.61	26.6	34.61	7.6
48.	трикозан	34.92	780.8	34.92	102.0
49.	тетракозан	35.94	97.1	35.94	12.2
50.	пентакозан	36.96	232.4	36.98	47.2
51.	гексакозан	37.93	29.0	37.93	3.4
52.	гептакозан	38.88	56.9	38.88	11.4
53.	сквален	39.94	232.7	39.94	26.5
54.	нонакозан	40.73	181.0	40.72	21.9

4. Встановлено, що основними терпеноїдними сполуками *C. subrotunda* є сквален та  $\alpha$ -терпенеол (кількісний вміст від суми терпеноїдів дорівнює 84.7 % та 9.5 %, відповідно); *C. turkestanica* – ліналоол, сквален,  $\alpha$ -терпенеол і гераніол (кількісний вміст яких від суми терпеноїдів дорівнює 27.2 %, 20.3 %, 17.2 % та 9.5 %, відповідно).

5. У досліджуваній сировині ідентифіковано: ароматичні сполуки; терпеноїди; похідні амінокислот; вищі вуглеводні, альдегіди та спирти. Одержані результати будуть використані при проведенні хемотаксономічного дослідження роду *Crataegus* L.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Будзикович Г. Интерпретация масс-спектров органических соединений / Г. Будзикович, К. Джерасси, Д. Уильямс. – М.: Мир, 1966. – 324 с.
2. Деревья и кустарники СССР // Ред. С.И. Соколов. – М., 1954. – Т. 3. – С. 873.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
4. Флора УРСР // Ред. Д.К. Зеров. – Київ, 1954. – Т. 4. – С. 49-79.
5. Хромато-мас-спектрометричне визначення компонентів етилацетатної фракції квіток *Crataegus arnoldiana* Sarg. / А.М. Ковальова, Н.В. Сидора, О.М. Александров, А.М. Комісаренко, А.Л. Вількер // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 54-60.
6. Хромато-мас-спектрометричне дослідження ліпофільних сполук глідів представників секції *Tenuifoliae* Sarg. / Н.В. Сидора, А.М. Ковальова, А.М. Комісаренко, М.Ф. Гончаров // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. - 2012. - № 2. – С. 26-30.
7. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities / С. Bicchi, С. Brunelli, С. Cordero, Р. Rubiolo et al. // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 1024. – № 1-2. – P. 195-207.
8. Weiborn – eine Pflanze nicht nur fürs Herz /U. Stuhlemmer, D. Fremel, С. Ousten, N. Simpson // Z. Phytotheur. – 2003. – Vol. 24, № 3. – P. 125-217.

## Резюме

Сидора Н.В.

**Хромато-мас-спектрометрическое исследование летучих соединений цветков боярышников представителей секции *Oxyacanthae* Loud.**

Хромато-мас-спектрометрическим методом проведено сравнительное исследование летучих соединений цветков *C. subrotunda* Klok. и *C. turkestanica* A. Pojark. секции *Oxyacanthae* Loud. Определено содержание терпеноидов в цветках, которое от общей суммы веществ составило для *C. subrotunda* Klok. – 9.3 %; *C. turkestanica* A. Pojark. – 20.02 %. Доминирующими терпеноидными соединениями для *C. subrotunda* Klok. являются сквален (84.7 %) и  $\alpha$ -терпинеол (9.5 %); *C. turkestanica* A. Pojark. – линалоол (27.2 %), сквален (20.3 %),  $\alpha$ -терпинеол (17.2 %) и гераниол (9.5 %).

**Ключевые слова:** хромато-мас-спектрометрический метод, летучие соединения, *Crataegus subrotunda* Klok., *Crataegus turkestanica* A. Pojark.

## Summary

Sydora N.V.

**Chromato-mass-spectrometric study of volatile compounds of hawthorn flowers of *Oxyacanthae* Loud.**

By chromato-mass spectrometry, a comparative study of volatile compounds of flowers of *Crataegus subrotunda* Klok. and *Crataegus turkestanica* A. Pojark. of *Oxyacanthae* Loud. has been performed. The terpenoid content in the flowers in the relation to the total substances content connections has been determined (9.3 per cent for *C. subrotunda* Klok.; 20.2 per cent for *C. turkestanica* A. Pojark.). Dominant terpenoid compounds for *C. subrotunda* Klok. were squalene (84.7 per cent) and -terpineol (9.5 per cent); for *C. turkestanica* A. Pojark. - linalool (27.2 per cent), squalene (20.3 per cent),  $\alpha$ -terpineol (17.2 per cent) and geraniol (9.5 per cent).

**Key words:** chromato-mass-spectrometry, volatile compounds, *Crataegus subrotunda* Klok., *Crataegus turkestanica* A. Pojark.

**Сидора Наталія Вячеславівна.** Закінчила Національну фармацевтичну академію України (2002). К.фарм.н. (2007). Доцент кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (2012).



**Одержання лікарських і допоміжних речовин**

УДК 54.057 : 543.5 : 615.2

Георгієвський Г.В., Мазур І.А.

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

**Обґрунтування напрямку синтезу та доведення хімічної будови  
1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду**

Обґрунтовано напрямку синтезу, доказано хімічну будову нової лікарської субстанції - 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду. Напрямок реакції її синтезу доведено за даними розрахунків енергетичних і геометричних характеристик вихідних речовин і можливих перехідних станів молекули. Будову синтезованої субстанції доказано із застосуванням комплексу фізико-хімічних методів – УФ-, ІЧ- та ЯМР-спектроскопії, ВЕРХ, ТШХ, хромато-мас-спектроскопії, потенціометрії та рентген-дифракційного методу.

*Ключові слова:* синтез, хімічна будова, 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію бромід, фізико-хімічні методи.

Створення нових метаболічних препаратів для лікування найбільш поширених у світі захворювань – хвороб кровообігу - є актуальною задачею фармації та медицини [1]. Рішенню цієї народногосподарської задачі в Україні присвячена робота колективу авторів під керівництвом проф. Мазура І.А., який створив перші вітчизняні оригінальні препарати – тіотриазолін і кардіотрил та їх індивідуальні та комбіновані лікарські форми у вигляді ін'єкційних розчинів, очних крапель, таблеток, супозиторіїв, мазей [2].

На теперішній час створено нову субстанцію, що також є похідним 1,2,4-триазолу - 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду. Ця субстанція виявляє широкий спектр фармакологічної дії та може застосовуватися при лікуванні хвороб системи кровообігу особливо у гострих випадках інфаркту міокарда [3].

В основу синтезу досліджуваної сполуки покладено реакцію алкілгалогенування 1,2,4-триазолу.

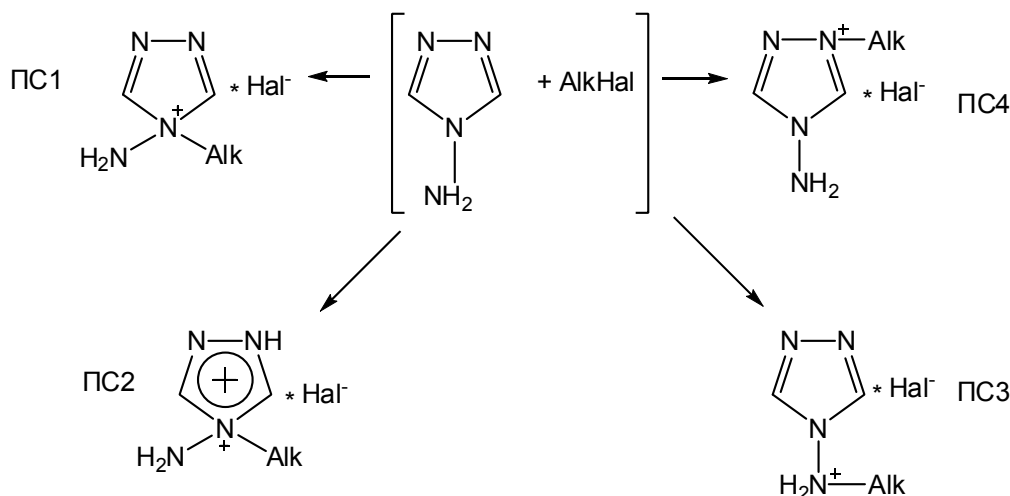
Метою даної роботи є обґрунтування напрямку синтезу та доведення хімічної будови 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду.

*Обґрунтування напрямку синтезу 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду*

Взаємодія 4-аміно-1,2,4-триазолу з електрофільними агентами, у залежності від їх природи та умов реакції, може йти за гетероциклічним азотом у положенні N1 або N2, або за аміним фрагментом [4] (Рис. 1).

Для оцінки можливого напрямку реакції алкілування 4-аміно-1,2,4-триазолу проведено розрахунки енергетичних і геометричних характеристик вихідних речовин і можливих перехідних станів. Квантово-хімічні обчислювання виконано згідно з версією модифікованого нехтування диференційним перекриттям (MNDO) [5, 6]. Вихідні параметри перехідних станів взято із роботи [4] та оптимізовано квадратичним методом Ньютона-Рафсона [5] у рамках версії програми молекулярної механіки PC MODEL.

Рисунок 1



**Взаємодія 4-аміно-1,2,4-триазолу з електрофільними агентами**

Оптимізацію геометрії реагентів і продуктів реакції алкілування виконано квазіквадратним методом Девідона-Флетчера-Пауела [6].

Рівень енергії перехідних станів встановлено за різницею розрахункових значень теплоти їх утворення та суми енергій утворення вихідних реагентів (Табл. 1). Одержані значення енергій, незважаючи на невелике завищення бар'єру реакції, що характерно для подібних розрахунків, розглядалися відносно, як динамічні індекси реакційної здатності [7].

Наведені розрахунки підтверджують висновки, що молекула 4-аміно-1,2,4-триазолу є копланарною, а триазольний цикл є ароматичним. Дані Табл. 2 свідчать, що максимальний негативний заряд локалізований за амінімним компонентом (-0.230), рівень електронного заряду на атомах азоту у положенні N1 і N2 значно менший (-0.130). Атака галогеналкілів за гетероциклічним азотом N4 виключена в силу електронного дефіциту (0.085), обумовленого впливом спряженої аміногрупи.

Порівняльний аналіз відносної енергії прогнозує перехідних станів реакції алкілування вихідного амінотриазолу більш інформативний. Так, високий рівень енергії перехідних станів ПС1 і ПС2 дозволяє однозначно виключити можливу атаку алкілувального агента за азотом N4, оскільки у цьому разі механізм реакції  $S_E2$  пов'язаний із порушенням ароматичного секстету, що енергетично край не вигідно [8, 10].

Через дестабілізуючий вплив гетероциклічного азоту N4 також енергетично нераціонально та менш ймовірно алкілування триазолу за амінімним фрагментом ПС3.

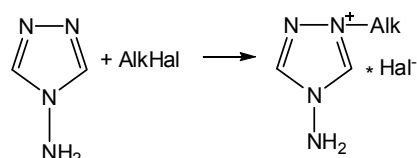
Навпаки, класичний механізм  $S_E2'$ -електрофільної атаки за азотом N1 добре узгоджується

із низьким рівнем розрахункової енергії створення перехідного стану ПС4 [3].

Таким чином, квантово-хімічним методом MNDO показано, що перебіг реакції взаємодії 4-аміно-1,2,4-триазолу із галогеналкілами енергетично переважно проходить через стадію кватернізації за гетероциклічним азотом у положенні N1 або N2 з утворенням 1-N-похідних, що узгоджується з розрахунками, одержаними М.І. Бармінім і В.В. Мельниковим [11].

Величини енергій (Табл. 1 і 2) підтверджують перебіг реакції 1,2,4-триазолу із  $\beta$ -брометилбензолом за гетероциклічним атомом азоту у положенні 1. Схему синтезу 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду наведено на Рис. 2.

Рисунок 2



#### Синтез 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду

Підкреслимо також, що відстежується лінійна залежність рівня енергії перехідних станів у досліджуваній реакції алкілування із константами Тафта аліфатичних фрагментів електрофільного реагента, що дозволяє вивести рівняння Гаммета для всіх досліджуваних серій та для більшої переконливості апелювати до них. Наприклад:

$$\text{Епс4} = (215.2 \pm a) + (b + c) \times r^* \quad (r = \dots)$$

#### ЯМР- та хромато-мас-спектроскопічні дослідження.

Доведення будови досліджуваних речовин проведено на основі даних  $^1\text{H}$  і  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектрів

Таблиця 1

#### Порівняльний рівень відносної енергії перехідних станів у реакції алкілування 4-аміно-1,2,4-триазолу бромистими вуглеводнями, розраховані методом MNDO

№ п/п	Alk						$\sigma^*$
		ПС1	ПС2	ПС3	ПС4	2.x-2.y	
1	$\text{C}_6\text{H}_{11}$	365	329	297	210	-60	-0.150
2	$\text{C}_3\text{H}_7$	367	331	299	212	-59	-0.115
3	$\text{CH}_3$	369	333	300	215	-58	0
4	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_5$	372	336	302	217	-56	0.110
5	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	375	338	304	219	-54	0.215

Примітка.

$\sigma^*$  — константа Тофта.

Таблиця 2

#### Локалізації електронної густини у молекулі 4-аміно-1,2,4-триазолу

Фрагмент	N1	N2	C3	H(C3)	N4	C5	H(C5)	N(NH <sub>2</sub> )	H(NH <sub>2</sub> )
Заряд, $\hat{e}$	-0.130	-0.130	0.075	0.008	0.085	0.079	0.008	-0.230	0.125

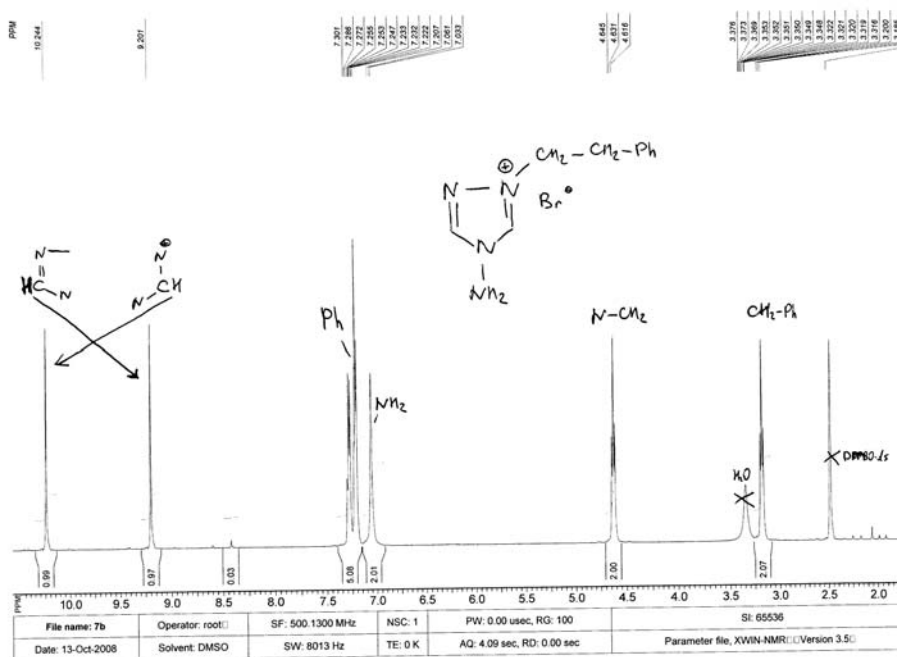
і хромато-мас-спектрів 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду (Рис. 3, 4).

<sup>1</sup>H ЯМР-спектри реєстрували на спектрометрі Varian Mercury VX-200 (робоча частота 200 МГц) в ДМСО-d<sub>6</sub> (внутрішній стандарт Me<sub>4</sub>Si). <sup>1</sup>H ЯМР-спектр свідчить, що при протонізації 4-аміно-1,2,4-триазолу з'являється триплет CH<sub>2</sub>-груп, N-CH<sub>2</sub> (2H, -3.35 мд); сигнал від

N-NH<sub>2</sub> групи зсунутий у слабе поле (від 6.22 мд до 7.03 мд). У слабе поле зсунутий також сигнал =C-H (від 8.39 мд до 9.2 мд) (-N=CH-) та до 10.24 мд (-N<sup>+</sup>≡CH-).

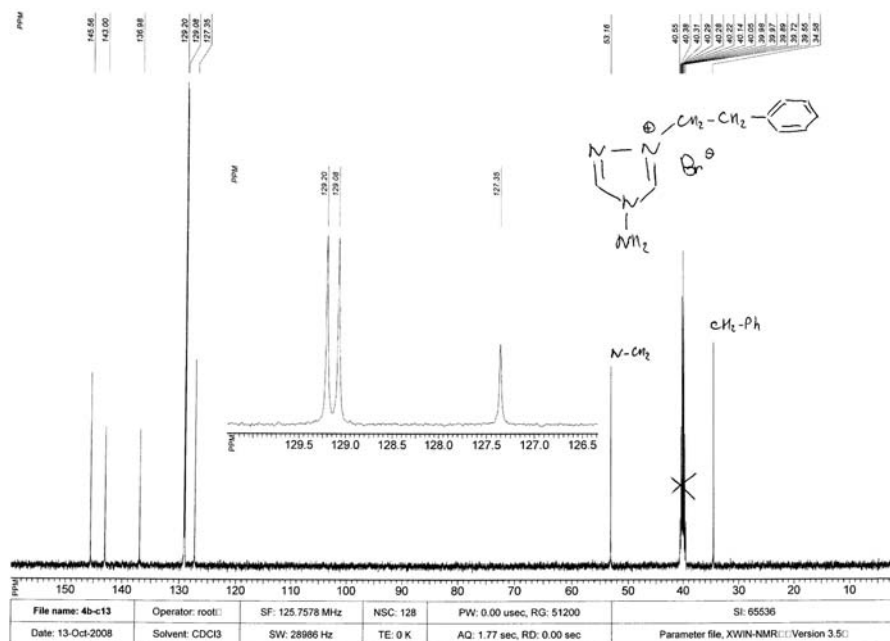
Протонування ендоатомів азоту спричинює посилення його електроакцепторного впливу на гетероцикл та, відповідно, на протон одного з ≡C-H зв'язків. Це призводить до більшого

Рисунок 3



<sup>1</sup>H ЯМР-спектр 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду

Рисунок 4



<sup>13</sup>C ЯМР-спектр 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду

зміщення його сигналів у слабе поле від 8.39 мд до 10.24 мд. Сигнал другої = С-Н групи також зсунутий у слабе поле до 9.2 мд, але на меншу величину через більшу віддаленість від амонійного атома азоту та послаблення спряження з ним.

Хромато-мас-спектри знято на приладі Agilent 1100 Series LC\MSD SL із детекторами UV-

detector\diode-array detector\ELSD (Evaporative Light Scattering Detector).

Молекулярному іону 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію відповідає інтенсивний пік  $M^+$  189.2 із брутто-формулою  $C_{19}H_{22}N_5$ .

Хромато-мас-спектроскопічний аналіз підтверджує індивідуальність 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію (Рис. 5).

Рисунок 5

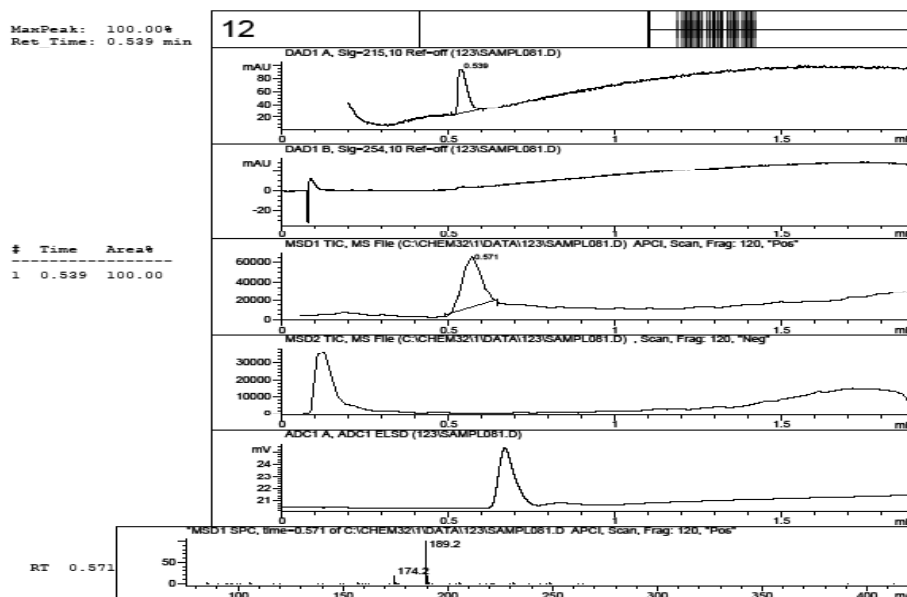
Хромато-мас-спектр 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду у спирті

Рисунок 6

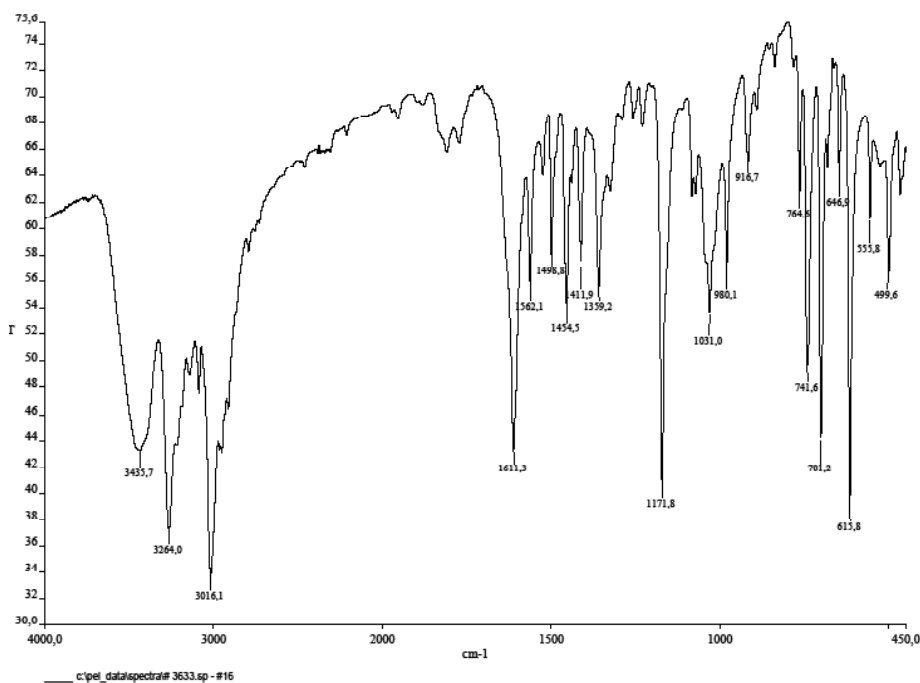
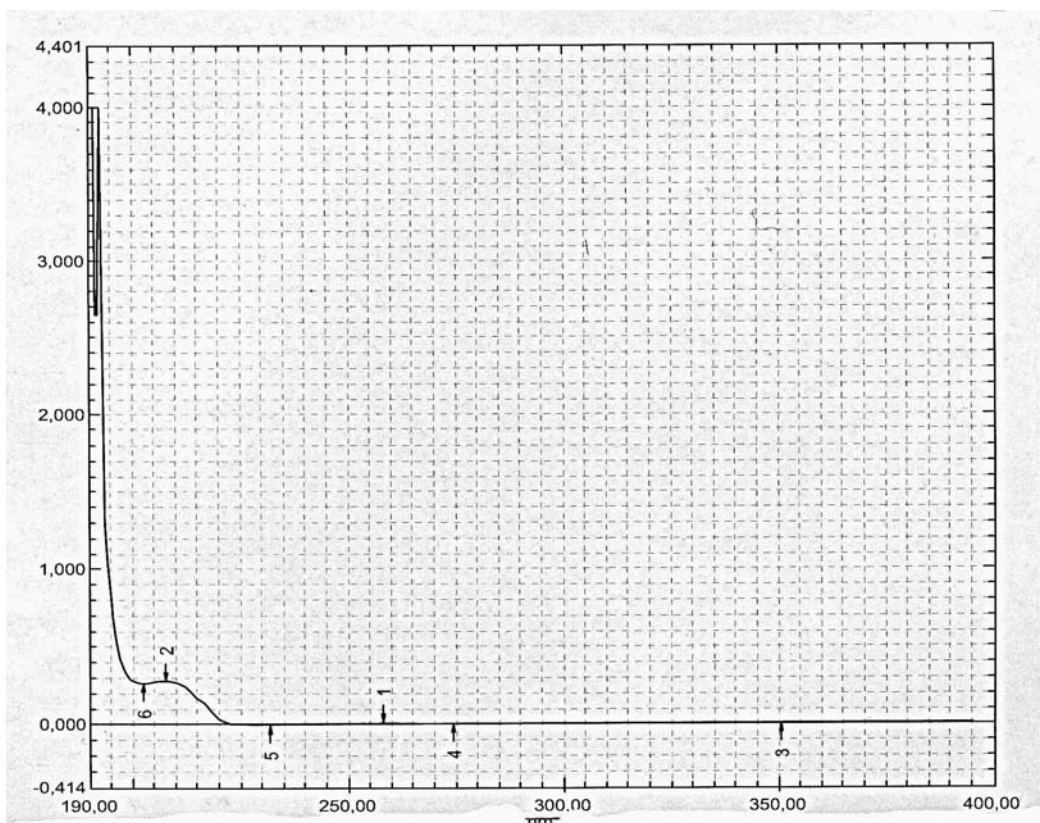
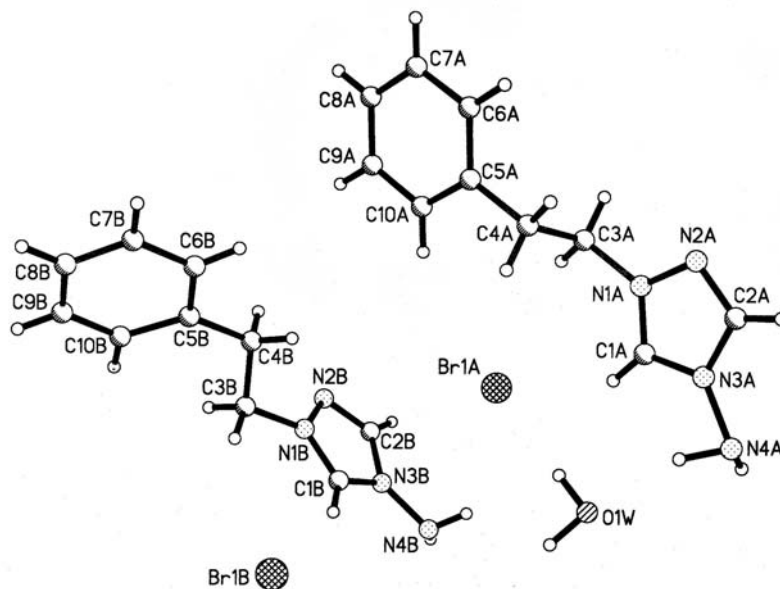
ІЧ-спектр 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду

Рисунок 7



УФ-спектр 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду у спирті

Рисунок 8



Будова 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду

## Елементний аналіз:

знайдено, %	C 44.48	H 4.90	Br 29.65	N 20.81
обчислено, %	C 44.63	H 4.987	Br 29.69	N 20.82

ІЧ- та УФ-спектри субстанції 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду наведено на Рис. 6 і Рис. 7, відповідно.

Підтвердження структури 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду рентгеноструктурним методом

Будову 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду підтверджено рентгендифракційним методом (Рис. 8). Дослідження проведено разом із співробітниками НТК «Інститут монокристалів» НАН України під керівництвом д.х.н. Шишкіна О.В. Структуру розшифровано прямим методом із використанням комплексу програм SHELXTL [12]. Параметри елементарної чарунки та інтенсивності 14333 відображень (6640 незалежних,  $R_{int} = 0.029$ ) виміряно на дифракторі «Хcalibur-3» (МоК $\alpha$ -випромінювання, CCD-детектор, графітовий монохроматор,  $\omega$ -сканування,  $2\theta_{max} = 60^\circ$ ).

Індивідуальність (чистоту) синтезованої сполуки підтверджено методами ВЕРХ та ТШХ. Вміст технологічних домішок не має перевищувати 0.5 %. Вміст діючої речовини визначено методом потенціометричного титрування у середовищі оцтової кислоти або оцтового ангідриду (99.0 % – 100.5 %).

Методики впроваджено на ДП «Завод хімреактив», м. Харків.

**Висновки**

1. Обґрунтовано напрямок синтезу 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду за даними розрахунків енергетичних і геометричних характеристик вихідних речовин: 4-аміно-1,2,4-триазолу й алкілгалогенів.

2. Із застосуванням комплексу фізико-хімічних методів встановлено хімічну будову синтезованої субстанції.

3. Синтез субстанції 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду впроваджено на ДП «Завод хімреактив», м. Харків.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Стан здоров'я народу України у зв'язку із хворобами системи кровообігу та можливі шляхи його покращання. Аналітично-статистичний посібник для лікарів - кардіологів, ревматологів, терапевтів загальної практики / Під ред. В.М. Коваленка. – К., 2004. – 124 с.
2. Метаболитотропные препараты / И.А. Мазур, И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев, Н.А. Волошин и др. – Запорожье, 2007. – 304 с.
3. Пат. 92692 Україна, МПК А61К 31/41, С07D 249/00, А61Р 9/00, А61К 9/20, А61К 9/08. Лікарський засіб для лікування ішемічної хвороби серця та гіпертонічної хвороби: Пат. 92692 Україна, МПК А61К 31/41, С07D 249/00, А61Р 9/00, А61К 9/20, А61К 9/08 І.А. Мазур, І.Ф. Беленічев,

Ю.М. Колеснік, Л.І. Кучеренко, М.А. Волошин, А.В. Абрамов, І.С. Чекман, Н.О. Горчакова, М.І. Загородній, В.Й. Мамчур, Р.С. Довгань, Г.В. Георгієвський (Україна); ТОВ «НВО «Фарматрон». – № 200906983; Заявл. 03.07.2009; Опубл. 25.11.2010, Бюл. № 22. – 6 с.

4. Общая органическая химия / Под ред. Д. Бартона и У.Д. Оллиса. - Т 3: Азотсодержащие соединения / Под ред. И.О. Сазерленда: Пер. с англ. - М.: Химия, 1982. - 736 с.
5. Mc. Iver J., Komornicky A. Structure of transition states in organic reactions: MINDO [modified intermediate neglect of differential overlap] 2 study of the cyclohexane inversion / Mc. Iver J., A. Komornicky // J. Amer. Chem. Soc. – 1972. – Vol. 94, № 8. – P. 2625-2633.
6. Quantum chemical studies of a model for peptide bond formation of formamide and water from ammonia and formic acid / T. Oie, G. Loew, S. Burt et al. // J. Amer. Chem. Soc. – 1982. – Vol. 104, № 23. – P. 6169-6174.
7. Квантово-химический расчет переходных состояний реакций ацилирования ароматических аминов малениновым ангидридом / А.В. Якиманский, В.А. Зубков, В.В. Кудрявцев и др. // Журн. орган. химии. – 1989. – Т. 25. - Вып. 12. - С.2479-2483.
8. Батунер Л.М. Математические методы в химической технике / Л.М. Батунер, М.Е. Позин. - Л.: Химия, 1971. - 676 с.
9. Chebanov V.A. Azaheterocycles Based on  $\alpha, \beta$  unsaturated Carbonyls / V.A. Chebanov, S.M. Desenko, T.W. Guzley. - Berlin: Springer-Verlag, 2008. – 260 p.
10. Smith M.B. Organic chemistry: Reactions. Mechanism and Structure / M.B. Smith, J. March. - Wiley interscience, 2007 - P. 495.
11. Бармин М.И. Новые amino-1,2,4-триазоли и тетразоли алканы / М.И. Бармин, В.В. Мельников. – Санкт-Петербург, 2002. – 239 с.
12. Sheldrick G.M. Acta crystallogr. - 2008. - Sect. A. - P. 112-122.

**Резюме**

Георгієвський Г.В., Мазур І.А.

**Обоснование направления синтеза и доказательство химического строения 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміда**

Обосновано направление синтеза, доказано химическое строение новой лекарственной субстанции - 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміда. Направление реакции ее синтеза доказано по данным расчетов энергетических и геометрических характеристик исходных веществ и возможных переходных состояний молекулы. Строение синтезированной субстанции доказано с применением комплекса физико-химических методов – УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, ВЭЖХ, ТСХ, хромато-масс-спектроскопии, потенциометрии и рентген-дифракционного метода.

Ключевые слова: синтез, химическое строение, 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію бромід, физико-химические методы.

**Summary**

Georgievsky G.V., Mazur I.A.

**Rationale of the synthesis direction and bringing of the chemical structure of 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolium bromide**

A direction of synthesis has been grounded; the chemical structure of the new drug substance 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolium bromide has been proved. Direction of synthesis reaction has been bringing in accordance with calculations of the energy and geometric characteristics of the reactants and possible transition states of the molecule. The structure of the synthesized substance has been proved with the complex physical and chemical methods (UV-, IR- and NMR-spectroscopy, HPLC, TLC, chromat-mass-spectroscopy, potentiometry and X-ray diffraction method).

Key words: synthesis, chemical structure, 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolium bromide, physical-chemical methods.

*Георгієвський Геннадій Вікторович*. К.фарм.н. Ст. наук. співр. Керівник наукового напрямку «Екстемпоральні лікарські засоби» відділу ДФУ Державного підприємства «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

*Мазур Іван Антонович*. Д.фарм.н. Професор. Професор кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.

## Готові лікарські засоби

УДК 615.457.07

Зинченко О.А., Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г., Коваленко С.М.  
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»  
Національний фармацевтичний університет

### Медико-біологічні показники очних крапель: забезпечення осмолярності при фармацевтичній розробці препаратів

На прикладі очних крапель із діючими речовинами різної хімічної природи та різної фармако-терапевтичної дії показано підходи до забезпечення оптимальних значень осмолярності офтальмологічних розчинів з урахуванням їх терапевтичного призначення та межі комфортних для ока при застосуванні значень осмолярності. Із використанням теоретичного розрахунку осмолярності й експериментального вимірювання осмолярності очних крапель проведено оцінку вкладу діючих і допоміжних речовин в осмолярність очних крапель з урахуванням їх фізико-хімічних властивостей. Показано, що основний вклад в осмолярність препарату вносять буферні компоненти. Експериментально отримані величини осмолярності досліджуваних очних крапель підтверджують правильність теоретичних розрахунків та застосованих підходів.

*Ключові слова:* лікарська форма, очні краплі, осмолярність, фармацевтична розробка, показник якості.

Особливості фармакокінетики офтальмологічних препаратів, обумовлені специфікою будови ока та механізмами всмоктування та розподілу діючої речовини, потребують забезпечення цілого ряду характеристик очних крапель, дотримання яких дозволить створити якісний препарат. Дослідження зі створення лікарської форми (ЛФ) мають проводитися при фармацевтичній розробці (ФР) препарату, що є етапом формування якості лікарських засобів.

Така ЛФ, як очні краплі, має відповідати як регламентованим показникам якості, наведеним у ДФУ та інших фармакопеях світу в загальних статтях на ЛФ так і медико-біологічним вимогам для здійснення ефективного та безпечно-го лікування.

Серед медико-біологічних показників при розробці очних крапель особливу увагу приділяють осмолярності, значення якої відповідає за комфортність препарату у застосуванні. Осмолярність і осмолярність - показники, що дозволяють оцінити сумарний вклад різних розчинених речовин в осмотичний тиск розчину. Обидва показники аналогічні по суті та відрізняються різним способом вираження концентрації розчинів (молярній і молярній, відповідно). Взаємозв'язок понять осмолярність, осмолярність, ізотонічність та осмотичний тиск наведено в [1].

Око є одним із сприйнятливих органів чуття, а очні краплі — одна з тих небагаточисленних

ЛФ при застосування якої поряд із терапевтичним ефектом практично відразу виявляється подразнювальна дія [2, 3]. Вже на незначне подразнення око реагує підвищенням слезовиділенням, через що, з одного боку, гальмується зорова здатність, з іншого боку - передчасно знижується концентрація діючої речовини, оскільки введений розчин вимивається, і, відповідно, зменшується біодоступність діючої речовини.

Відповідність осмолярності очних крапель осмолярності слізної рідини є бажаною при лікуванні більшості очних захворювань. Проте для більшої ефективності і кращої переносимості лікарського засобу (ЛЗ) величина осмолярності деяких препаратів, залежно від їх терапевтичного призначення, може відрізнятись від нормальних значень осмолярності слізної рідини (307 мосмоль/л) [4]. Згідно з [5, 6], прийнятна для ока межа величин осмолярності становить (220-680) мосмоль/л, що відповідає концентраціям натрію хлориду (0.6-2.0) %. У ряді робіт [7, 8.] відмічено, що деякі очні краплі можуть бути навмисно гіпертонічними для посилення абсорбції та забезпечення достатньої для швидкої й ефективної дії концентрації активних компонентів. При використанні малої кількості таких розчинів відбувається швидке розбавлення краплі слізною рідиною, а відчуття дискомфорту, викликане гіпертонічністю, тимчасове. В останнє десятиліття у зв'язку з розвитком напрямку

лікування такого захворювання, як синдром «сухого ока», було встановлено, що гіпотонічні розчини переносяться навіть краще, ніж ізотонічні. Так, наприклад, при лікуванні даного захворювання 0.4 % розчином натрію гіалуронату з осмолярністю 150 мосмоль/л відмічено не лише кращу переносимість препарату, але й поліпшення характеристик слізної плівки, стан клітин епітелію рогівки та кон'юнктиви, тобто, зниження симптомів «сухого ока» [9, 10, 11]. Відмічено також, що більшу комфортність для пацієнтів, що носять контактні лінзи, забезпечують гіпотонічні розчини [12]. Тому при розробці офтальмологічних препаратів для забезпечення їх максимальної ефективності та комфортності при застосуванні слід враховувати специфіку конкретного захворювання.

Враховуючи важливість такого показника, як осмолярність, при проведенні ФР забезпечення оптимальних значень осмолярності препарату може бути виділено у окрему стадію на етапі розробки складу очних крапель, на якій обґрунтовується вибір якісного та кількісного складу очних крапель з урахуванням необхідних значень осмолярності. Певне значення осмолярності у складі крапель створюють компоненти — діючі та допоміжні речовини. Оцінюючи вклад різних розчинених речовин в осмотичний тиск розчину та варіюючи якісним та кількісним складом ДР можна створити очні краплі з необхідним для конкретної мети значенням осмолярності.

Мета даної роботи полягає в розгляді підходів до забезпечення оптимальних значень осмолярності офтальмологічних розчинів виходячи з їх терапевтичного призначення і межі прийнятних для ока при застосуванні значень осмолярності на прикладі очних крапель з діючими речовинами різної хімічної природи та різної фармако-терапевтичної дії.

#### Об'єкти та методи

Об'єктами дослідження обрано:

1. Діючі (дексаметазону натрію фосфат, калію йодид, таурин, сульфациламід натрію, тимололу малеат, тропікамід, ципрофлоксацину гідрохлорид) та допоміжні (ацетатний, боратний та фосфатний буферні розчини, бензалконію хлорид, хлоргексидин діацетат, ніпагін, натрію едетат, натрію метабісульфіт, натрію хлорид, маніт) речовини, що використовуються в очних краплях, а також їх модельні суміші.

2. Розроблені на основі діючих речовин лікарські препарати у формі крапель, а саме: Дексаметазону фосфат, очні краплі, 0.1 %; Калію йодид, очні краплі, 2 %; Тауфон, очні краплі, 4 %; Тимо-

лол, очні краплі 0.5 %; Тропікамід, очні краплі, 0.5 %; Ципроксол, краплі очні/вушні 0.3 %.

Осмолярність розраховували теоретично згідно з ДФУ [6], для речовин, що не дисоціюють на іони і осмолярність яких не може бути розрахована вищенаведеним методом — за допомогою еквівалентів за натрію хлоридом [5, 13].

Осмолярність модельних сумішей очних крапель та готових лікарських засобів визначали експериментально по зниженню температури замерзання розчину згідно [6] за допомогою міліосмометра-кріоскопа МТ-5, виробництва фірми МПП «Буревестник» (Росія). Прилад калібрували та перевіряли за стандартним розчином натрію хлориду 290 мосмоль/кг. Об'єм проби становив (0.20-0.25) мл.

Паралельно проводили розрахунок іонної сили іонів у складі очних крапель. Для порівняння було розраховано іонну силу розчину 0.9 % (об/об) натрію хлориду та слізної рідини. При розрахунку іонної сили слізної рідини було зроблено припущення, що основну частку до цього показника вносять неорганічні компоненти, склад яких наведено в [13]. Розрахунок проводили за методикою, описаною в [14].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Оскільки осмолярність не є показником, обов'язковим для контролю, у монографіях різних фармакопей світу на конкретні очні краплі величина даного показника не наводиться. Проте, провідні зарубіжні фармацевтичні фірми, що розробляють і здійснюють виробництво очних крапель, враховують цей показник при створенні очних крапель і контролюють його при випуску і у процесі зберігання препаратів. Межі допусків для значень осмолярності для кожного препарату обґрунтовують індивідуально з урахуванням різних чинників. Враховуючи, що осмолярність препарату створюється, в основному, речовинами у вигляді солей і, виходячи із критеріїв прийнятності для кількісного вмісту для діючих і допоміжних речовин при зберіганні ( $\pm 10$ ) % [15], можна передбачити, що величина допуску для осмолярності також може становити ( $\pm 10$ ) %. Проте, аналіз граничних значень величин осмолярності, наведених у сертифікатах якості на препарати, показав, що величина допусків може відрізнятись від ( $\pm 10$ ) % як у більшу, так і в меншу сторону, але не перевищує ( $\pm 15$ ) %. Ця величина, мабуть, включає і показник похибки приладів, призначених для вимірювання осмолярності.

При розробці складів очних крапель оцінка показників, що характеризують осмотичний тиск розчину, досягається теоретичним роз-



рахунком осмолярності та експериментальним вимірюванням осмолярності.

Теоретичний розрахунок осмолярності можна проводити двома шляхами:

- сума коефіцієнтів ізотонічності за натрію хлоридом для кожної речовини віднімається від величини 0.9 %, а відсутня різниця коректується додаванням відповідних кількостей допоміжних речовин;
- теоретично розраховується осмолярність кожної речовини, ці значення підсумовуються, а відсутню різницю до необхідного значення осмолярності також коректують додаванням відповідних кількостей допоміжних речовин.

Усі очні краплі — це багатокомпонентні системи, для забезпечення необхідних показників якості яких до їх складу, звичайно, включають низку речовин: діючі речовини, буферні компоненти, речовини для коректування осмолярності (ізотонічності) і рН, антимікробні консерванти, за необхідності стабілізатори (комплексоутворювачі, антиоксиданти), в'язкі компоненти, речовини, що сприяють поліпшенню розчинності діючої речовини. Кожна речовина, у залежності від її фізико-хімічних властивостей (молекулярної маси, здатності до дисоціації), використаної

концентрації та фізико-хімічних властивостей навколишнього середовища вкладає свій внесок в осмолярність очних крапель. Необхідно також відзначати, що вибір допоміжних речовин та їх кількостей має проводитися з урахуванням створюваної ними іонної сили в розчині, яка впливає на значення осмолярності, що витікає із взаємозв'язку обох понять. Крім того, цей показник забезпечує проникнення діючих речовин у внутрішню структуру ока: у багатьох роботах відзначається зниження біодоступності діючих речовин зі збільшенням іонної сили розчину [16, 17, 18]. Таким чином, для вибору оптимальних кількостей допоміжних речовин попередньо слід оцінити внесок усіх компонентів препарату в осмолярність.

У Табл. 1 наведено розрахункові значення осмолярності терапевтичних концентрацій діючих речовин очних крапель. Ці значення знаходяться у досить широкому інтервалі, що пов'язано як із фізико-хімічними властивостями діючих речовин, так і з їх концентраціями.

Більшість діючих речовин, що використовуються в складі очних крапель, містяться у незначних концентраціях зі значеннями в ряду від 0.05 % до 1 %. Тому такі речовини, як, наприклад, дексаметазону натрію фосфат, тимололу мале-

Таблиця 1

**Розрахункові значення осмолярності діючих речовин, що використовують в очних краплях**

Речовина	Молекулярна маса	Концентрація, г/л	Число частинок*	Осмолярність, мосмоль/л
дексаметазону натрію фосфат	516.4	1.0	3	5.81
калію йодид	166.0	20.0	2	241.00
сульфацетамід натрію	254.2	20.0	2	157.35
		30.0		236.03
таурин	125.14	40.0	1	319.64
тимололу малеат	432.5	6.83	2	31.58
тропікамід	284.4	5.0	1	17.6
ципрофлоксацину гідрохлорид	367.8	3.5	2	19.03

Примітка.

\* — число частинок, що утворюються при розчиненні однієї молекули речовини.

Таблиця 2

**Розрахункові значення осмолярності допоміжних речовин, що використовують в очних краплях**

Речовина	Молекулярна маса	Концентрація, г/л	Число частинок	Осмолярність, мосмоль/л
бензалконію хлорид	354.0	0.06	2	0.34
		0.1	2	0.57
натрію метабісульфіт	190.1	0.05	3	7.89
		0.1	3	15.79
ніпагін	152.1	2.0	1	13.15
натрію едетат	372.24	0.1	3	0.81
		0.2		1.61
		0.5		4.03
хлоргексидин діацетат	625.6	0.05	3	0.24

ат, тропікамід або ципрофлоксацину гідрохлорид, як правило, створюють незначне значення осмолярності, а їх препарати обов'язково потребують доведення значення цього показника до значень комфортної області. Калію йодид і сульфациламід натрію використовуються у високих терапевтичних концентраціях і створюють значення осмолярності близько 240 мосмоль/л, що є недостатнім для оптимальних значень осмолярності очних крапель і тому осмолярність їх препаратів потребує коректування. Таурин - приклад діючої речовини, що забезпечує комфортне значення осмолярності у терапевтичній концентрації 4 %, що традиційно застосовують в очних краплях, та її препарати не потребують коректування осмолярності.

Такі компоненти, як антимікробні консерванти та інші стабілізатори, завдяки застосовуваним низьким концентраціям або слабій здатності до дисоціації, не впливають на значення осмолярності препарату (Табл. 2).

Як показують розрахункові й експериментальні дані, основний внесок у значення осмолярності препарату вносять буферні компоненти. Тому потрібна область осмолярності очних крапель звичайно досягається або регулюванням кількостей цих компонентів, або додаванням визначених кількостей допоміжних речовин, що використовуються для коректування осмолярності. Із цією метою звичайно використовують натрію хлорид, калію хлорид, сорбіт, маніт або гліцерин [19].

Основним критерієм вибору буферних компонентів та їх кількостей є збереження балансу між максимально прийнятною буферною ємністю розчину та їх внеском в осмолярність препарату. Величина буферної ємності має бути, з одного боку, достатньо великою, аби забезпечити збереження якості препарату на весь період його зберігання і застосування, з іншого боку — досить низькою, аби не впливати на рН

слізної рідини при інстиляції краплі препарату в око. У разі відсутності впливу на стабільність інгредієнтів препарату кількість буферних компонентів може бути зменшена для коректування значень осмолярності. Прикладом є ацетатна та фосфатна буферні системи, що мають високу буферну ємність. Зменшення кількості буферних компонентів при збереженні їх співвідношення дозволяє знизити їх внесок в осмолярність препарату.

Значення осмолярності буферних систем, що використовують в очних краплях, наведені в Табл. 3.

Очні краплі тимололу малеату є прикладом препарату, для забезпечення необхідного значення осмолярності якого було обрано додавання визначеної кількості неорганічної речовини - натрію хлориду.

Із метою вибору меж необхідної кількості натрію хлориду попередньо проведено розрахунок осмолярності модельних сумішей препарату у залежності від кількості натрію хлориду, що обрана в більш широкому ряду концентрацій — від 4 % до 6.5 %. Враховуючи, що розрахункове значення осмолярності, як правило, вище значення, отриманого експериментально, було отримано залежність експериментальних значень осмолярності модельних сумішей очних крапель від кількості натрію хлориду у більш вузькому ряду концентрацій. Результати впливу концентрації натрію хлориду на розрахункову осмолярність та експериментальну осмолярність модельних сумішей очних крапель представлено в Табл. 4.

Враховуючи результати проведених досліджень для введення до складу препарату було обрано концентрацію натрію хлориду 6.4 г/л з експериментальною осмолярністю (300±3) мосмоль/кг.

Очні краплі ципрофлоксацину є прикладом препарату, для забезпечення необхідного зна-

Таблиця 3

**Розрахункові й експериментальні значення осмолярності (осмолярності) буферних систем, що використовують в офтальмологічних препаратах**

Буферна система	рН	Розрахункова осмолярність буфера, мосмоль/л	Експериментальна осмолярність буфера, мосмоль/кг
боратна буферна система	6.5	247.42	246±3
ацетатна буферна система	4.7	76.34 <sup>1</sup>	75±3
		6.8 <sup>2</sup>	6±3
фосфатна буферна система	7.2	179.96 <sup>3</sup>	175±3
		89.93 <sup>4</sup>	86±3

1 — осмолярність для кількості компонентів, що наведено в [5];

2 — осмолярність для кількості компонентів, зменшених у 10 раз;

3 — осмолярність для кількості компонентів, що наведено в [5];

4 — осмолярність для кількості компонентів, зменшених у 2 рази.

Таблиця 4

**Внесок різних кількостей натрію хлориду в розрахункову осмолярність та експериментальну осмолярність модельних сумішей очних крапель тимололу малеату**

Концентрація NaCl, г/л	Розрахункова осмолярність NaCl, мосмоль/л	Розрахункова осмолярність модельних сумішей*, мосмоль/л	Експериментальна осмолярність модельних сумішей, мосмоль/кг
4.0	136.75	264.20	-
5.0	170.94	298.39	-
1	2	3	4
6.0	205.13	332.58	287
6.1	208.55	336.00	291
6.2	211.96	339.41	293
6.3	215.38	342.83	297
6.4	218.80	346.25	300
6.5	222.22	349.67	303

Примітка.

\* — тимололу малеат + натрію хлорид + натрію едетат + фосфатний буфер + бензалконію хлорид.

Таблиця 5

**Вплив різних кількостей речовин, що забезпечують необхідну осмолярність/осмолярність модельних сумішей очних крапель ципрофлоксацину гідрохлориду**

Кількість маніту, г/л	Еквівалентна кількість NaCl, г/л	Розрахункова осмолярність NaCl (маніт), мосмоль/л	Розрахункова осмолярність модельної суміші*, мосмоль/л	Експериментальна осмолярність модельної суміші, мосмоль/кг
10.0	1.7	58.11	88.54	—
40.0	6.8	232.47	262.90	263
45.0	7.7	263.25	293.68	290
46.0	7.8	267.35	297.78	295
47.0	7.9	273.16	303.59	300

Примітка.

\* — ципрофлоксацину гідрохлорид + натрію едетат + боратний буфер + бензалконію хлорид.

Таблиця 6

**Значення осмолярності, осмолярності та іонної сили очних крапель**

Об'єкт	Розрахункова осмолярність, мосмоль/л	Експериментальна осмолярність, мосмоль/кг	Іонна сила
0.9 % розчин NaCl	307	300 (0.9463 г NaCl в 1 кг H <sub>2</sub> O)	15.38×10 <sup>-2</sup>
слізна рідина	—	303.7 + / - 22.9	17.17×10 <sup>-2</sup> – 29.67×10 <sup>-2</sup>
очні краплі дексаметазону натрію фосфату	257.26	247±3	1.08×10 <sup>-2</sup>
очні краплі ципрофлоксацину гідрохлориду	297.78	295±3	1.65×10 <sup>-2</sup>
очні краплі тимололу малеату	346.25	300±3	20.7×10 <sup>-2</sup>
очні краплі калію йодиду	316.06	283±3	15.4×10 <sup>-2</sup>
тауфон, очні краплі, 4 %	326.22	319±3	— *
очні краплі тропікамідю	292.48	280±3	13.77×10 <sup>-2</sup>

Примітка.

\* — розрахунок іонної сили препарату неможливий через відсутність здатності компонентів препарату до дисоціації.

чення осмолярності якого було обрано додавання визначеної кількості органічної речовини - маніту. Для таких речовин, як маніт, що не дисоціюють на іони та для яких недоцільно розраховувати осмолярність методом, наведеним в ДФУ [6], застосовують ізотонічні еквіваленти за натрію хлоридом (кількість натрію хлориду, що за тих самих умов створює осмотичний тиск, однаковий з осмотичним тиском 1 г діючої речовини або допоміжної речовини) [5, 13].

Результати розрахунку осмолярності модельних сумішей препарату у залежності від різних кількостей речовин, що забезпечують необхідну тонічність, представлено в Табл. 5, із якої видно, що маніт у концентраціях (4.5-4.7) % забезпечує близькі значення осмолярності модельних сумішей. До складу препарату маніт введено у концентрації 4.6 %.

Із огляду на те, що осмолярність розчинів, що теоретично розрахована як сума осмолярностей кожного компонента, є величиною приблизною, провівши теоретичний розрахунок (осмолярність), обов'язково слід встановити експериментальне значення (осмолярність) і, якщо необхідно, провести коректування. Осмотичний тиск реального розчину менший, ніж ідеального розчину через взаємодію між молекулами розчиненої речовини в розчині або молекулами розчиненої речовини і розчинника. Такі взаємодії знижують тиск, що чинять молекули розчиненої речовини на напівпроникну мембрану, зменшуючи експериментальне значення осмолярності порівняно з теоретичним значенням. Ця різниця пов'язана із молярним осмотичним коефіцієнтом, що враховує відхилення розчину від ідеального. Його значення залежить від концентрації розчинених речовин у розчині, його хімічних властивостей та іонних характеристик [5].

Вищезазначене підтверджується даними Табл. 6, де наведено експериментальні величини осмолярності, що отримані для досліджуваних очних крапель із діючими речовинами різної хімічної природи та різної фармако-терапевтичної дії після попередньої оцінки внеску усіх обраних компонентів в осмолярність препарату.

Так, найбільша різниця у значеннях між осмолярністю та осмолярністю спостерігається для очних крапель тимололу малеату та калію йодиду, що пов'язано зі збільшенням гальмуючої дії іонної атмосфери на ступінь дисоціації електролітів через збільшення їх кількості у препаратах. Це підтверджує розрахунок іонної сили препаратів, як наведено в Табл. 6.

Значення осмолярності усіх досліджених препаратів знаходяться у прийнятних межах

величин осмолярності, що забезпечують комфортність очних крапель у застосуванні. Найбільш наближеними до значень осмолярності слізної рідини та 0.9 % розчину натрію хлориду є очні краплі ципрофлоксацину гідрохлориду, тимололу малеату, калію йодиду та тропікаміду. Осмолярність очних крапель дексаметазону знаходиться дещо у гіпотонічній області, що викликано вибором компонентів та їх кількостями для цих очних крапель з урахуванням тенденції застосування гіпотонічних препаратів для лікування захворювань очей, пов'язаних із пошкодженням поверхні ока та розвитком запальних процесів [12].

Розраховані значення іонної сили досліджених очних крапель не перевищують розрахункове значення іонної сили слізної рідини, що гарантує забезпечення умов комфортності очних крапель при застосуванні.

### Висновки

1. Розглянуто підходи до забезпечення оптимальних значень осмолярності офтальмологічних розчинів з урахуванням їх терапевтичного призначення і прийнятних для ока при застосуванні значень на прикладі очних крапель з діючими речовинами різної хімічної природи та допоміжними речовинами, що використовують в складах офтальмологічних препаратів.

2. Проведено оцінку вкладу діючих і допоміжних речовин в осмолярність очних крапель. Встановлено, що осмолярність діючих речовин варіює у широких межах, основний вклад в осмолярність препарату вносять буферні компоненти. При розробці офтальмологічних препаратів необхідно враховувати фізико-хімічні властивості компонентів препарату та специфіку конкретного захворювання для забезпечення їх максимальної ефективності та комфортності при застосуванні.

3. Величини осмолярності й іонної сили усіх досліджених очних крапель знаходяться в області прийнятних для ока значень.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Осмолярность, осмолярность, изотоничность как характеристики осмотического давления растворов / Л.Н. Андриюкова, М.Г. Левин, И.С. Терно и др. // Фармаком. — 1999. — № 6. — С. 37-39.
2. Гайдамака Т.Б. Результаты клинической апробации комбинированных глазных капель, содержащих гентамицин и декаметоксин / Т.Б. Гайдамака, Л.Н. Андриюкова, Е.Н. Кузнецова // Офтальмологический журн. — 2001 — № 5 (382). — С. 32-33.
3. Фетисова Е.Г. Лекарственная аллергия в офтальмологии / Е.Г. Фетисова, Л.Н. Андриюкова // Фармаком. — 2003. — № 2. — С. 113-117.
4. Андриюкова Л.Н. К вопросу об осмолярности при разработке офтальмологических и инфузионных препаратов / Л.Н. Андриюкова // Фармаком — 1996 — № 1/2 — С. 13-15.

5. United States Pharmacopoeia. — XXXIII ed. — Rockville, 2010. — Vol. 1-3.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEG, 2001 — 556 с.
7. Tournier N. Voriconazole Eye Drop Solution Antoine Dupuis / Nicolas Tournier, Gwenae Le Moal, Nicolas Venisse // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2009. — Vol. 53, № 2. — P. 798-799.
8. Fortified antibiotic (vancomycin, amikacin and ceftazidime) eye drop stability assessment at 20 degrees C / V. Che dru-Legros, M. Fines-Guyon, A. Che rel et al. // Journ. Fr. Ophthalmol. — 2007. — Vol. 30. — P. 807 — 813.
9. Comparison of hypotonic and isotonic solutions containing sodium hyaluronate on the symptomatic treatment of dry eye patients / V. Papa, P. Aragona, S. Russo et al. // Ophthalmologica. — 2001. — Vol. 215. — P. 124-127.
10. Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjögren's syndrome patients / P. Aragona, G. Di Stefano, F. Ferreri [ et al.] // Br. Journ. Ophthalmol. — 2002. — Vol. 86, № 8. — P. 879—884.
11. Troiano P. Effect of hypotonic 0.4% hyaluronic acid drops in dry eye patients: a cross-over study / P. Troiano, G. Monaco // Cornea. — 2008. — Vol. 27, № 10. — P. 1126-1130.
12. Stahl U. Role of hypo-osmotic saline drops in ocular comfort during contact lens wear / U. Stahl, M. Willcox, F. Stapleton // Cont. Lens Anterior Eye. — 2010. — Vol. 33, № 2. — P. 68-75.
13. Pharmazeutische Technologie / hrsg. M. von Sucher, P. Fuchs, Speiser P. Bearb. von W. Becher — Stuttgart: Thieme, 1978 1. Aufl — 894 s.
14. Пилюпенко А.Т. Аналитическая химия : в 2-х книгах / А.Т. Пилюпенко, И.В. Пятницкий. — Кн. 1. - М.: Химия, 1990. — С. 42.
15. Настанова 42-3.2:2004. Настанови з якості. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності / М. Ляпунов, В. Георгієвський, О. Безугла та ін. — Київ: МОЗ України, 2004. — 38 с.
16. Drug Release from Cation Exchange Membrane in Rabbit Eye / Tommy Tarvainer, Bror Svarevar, Marianne Saaskilaht [et al.] // Journ. of Ocular Pharmacology and Therapeutics. — 1999. — Vol. 15, № 6. — P. 497-504.
17. Malhotra M. Effect of preservative, antioxidant and viscolizing agents on in vitro transcorneal permeation of ketorolac tromethamine / Manjusha Malhotra, D K Majumdar Indian // Journ. Exp. Biol. — 2002. — Vol. 40, № 5. — P. 555-559.
18. Пат. 0917875 Европа, МПК А61К31/55; А61К31/551; А61К31/5517; А61К47/10; А61К47/26; А61К9/00; А61К9/08; А61Р27/02; С07Д495/14; А61К31/55; А61К31/551; А61К47/10; А61К47/26; А61К9/00; А61К9/08; А61Р27/00; С07Д495/00; (IPC1-7): А61К31/55; А61К47/10; А61К47/26; А61К9/08. Aqueous eye drops containing apafant as principal agent / Miyagi Syogo, Kuwano Mitsuaki, Kunou Noriyuki (Япония); SANTEN PHARMA CO LTD (Япония) — № EP19960933602; заявл. 09.10.1996; опубл. 26.05.1999. — 10 с.
19. Лекарственные средства для офтальмологии и оториноларингологии / Андрюкова Л.Н., Красичкова Е.А., Кузнецова Е.Н. [и др.] // «Технология и стандартизация лекарств»: сб. науч. тр. / под ред. ак. Георгиевского В.П.; проф. Конева Ф.А. — Харьков: ООО "PIPEG", 2000. — С. 389-414.

#### Резюме

Зинченко А.А., Андрюкова Л.Н., Фетисова Е.Г., Коваленко С.Н.

#### Медико-биологические показатели глазных капель: обеспечение осмолярности при фармацевтической разработке препаратов

На примере глазных капель с действующими веществами разной химической природы и разного фармако-

терапевтического действия показаны подходы к обеспечению оптимальных значений осмолярности офтальмологических растворов с учетом их терапевтического назначения и предела комфортных для глаза при применении значений осмолярности. С использованием теоретического расчета осмолярности и экспериментального измерения осмолярности глазных капель проведена оценка вклада действующих и вспомогательных веществ в осмолярность глазных капель с учетом их физико-химических свойств. Показано, что основной вклад в осмолярность препарата вносят буферные компоненты. Экспериментально полученные величины осмолярности исследуемых глазных капель подтверждают правильность теоретических расчетов и примененных подходов.

**Ключевые слова:** лекарственная форма, глазные капли, осмолярность, фармацевтическая разработка, показатель качества.

#### Summary

Zinchenko A.A., Andrukova L.T., Fetisova E.G., Kovalenko S.M.

#### Medical and biological indices of eye drops: assurance of an osmolarity in the pharmaceutical development of drugs

At the example of eye drops with active substances of different chemical nature and different pharmaco-therapeutic effects, approaches to optimal values of an osmolarity of ophthalmic solutions according to their therapeutic use and comfortable to the eye limits the application of values of the osmolarity have been demonstrated. Using theoretical calculation and experimental measurement of the osmolarity of eye drops, the contribution of active substances and excipients to the osmolarity eye drops according to their physico-chemical properties has been evaluated. It was shown that the main contribution to the osmolarity of the drug has been provided by buffer components. Experimentally obtained data of osmolarity of the studied eye drops confirmed the correctness of theoretical calculations and applied approaches.

**Key words:** dosage form, eye drops, osmolarity, pharmaceutical development, quality index.

**Зинченко Александр Анатолійович** (н. 1956). Закінчив Харківський державний університет (1983). Зав. лаб. фармакопейного аналізу ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». К.фарм.н. (2006).

**Андрюкова Лариса Миколаївна.** Закінчила Харківський політехнічний інститут (1982), Національний аерокосмічний університет «ХАІ» (2002). Ст.наук. співр. Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів Національного фармацевтичного університету (2011). Д.фарм.н. (2011). Ст.наук.співр. (2000).

**Фетисова Олена Геннадіївна.** Закінчила Харківський державний університет (1995). Ст.наук.співр. Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів Національного фармацевтичного університету (2011). К.фарм.н. (2008).

**Коваленко Сергій Миколайович** (н. 1959). Закінчив хімічний факультет Харківського державного університету (1983). Проректор з наукової роботи Національного фармацевтичного університету. Д.х.н.

## Стандартизація лікарських засобів

УДК 543.544.5 : 664.34

Зинченко А.А., Боброва М.Е.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

### Определение сквалена в растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Проведена разработка и изучены метрологические характеристики методики качественного и количественного определения сквалена в растительных маслах методом ВЭЖХ без предварительного выделения неомыляемого остатка. Показано, что основные валидационные характеристики методики удовлетворяют требованиям ГФУ.

*Ключевые слова:* сквален, растительные масла, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, валидация, метрологические характеристики, Государственная Фармакопея Украины.

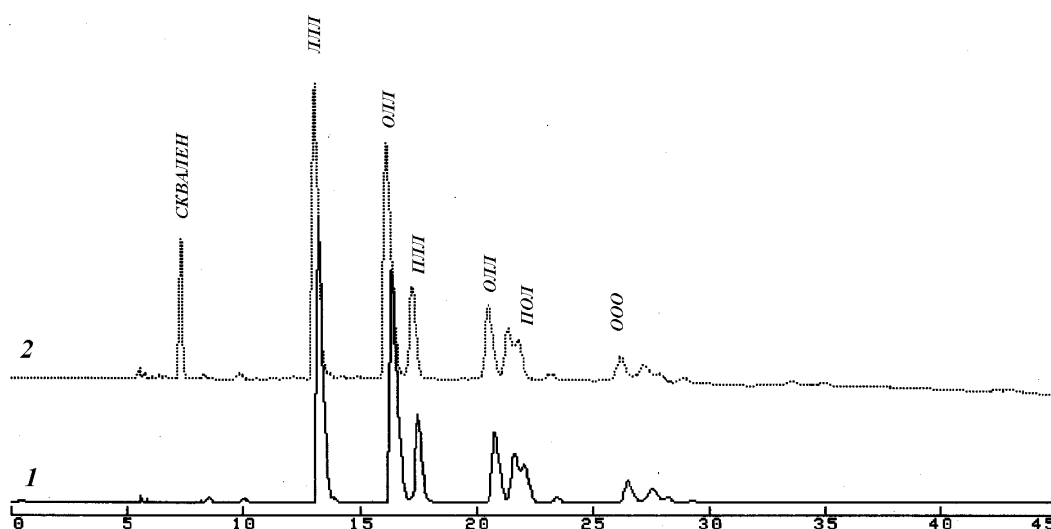
Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-тетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен) является одним из биологически активных компонентов растительных масел. Метаболизм сквалена изучен и описан в работе [1]. Из растительных масел значительные количества сквалена содержатся в оливковом масле, масле семян амаранта (до 9%), масле арахиса и других маслах. Содержащие сквален растительные масла находят применение в фармацевтической, косметической, пищевой промышленности. А поскольку стоимость масел (в первую очередь, масла семян амаранта) зависит от содержания в них сквалена, актуальным становится и разработка методик его количественного определения.

В работе [2] приведены различные варианты методик количественного определения сквалена методом газовой хроматографии непосредственно в растительных маслах без предварительного выделения сквалена в виде неомыляемого остатка. Каждая из описанных методик требует модификации пневматической схемы подключения колонок, что ведет к определенным материальным затратам.

Целью данной работы является разработка методики количественного определения сквалена методом ВЭЖХ с использованием обычной комплектации хроматографа.

В монографии Европейской Фармакопеи (EP) «Sesame oil, refined» [3] описана методика

Рисунок 1



Хроматограммы масла подсолнечного (1) и масла подсолнечного с добавкой сквалена (2), полученные в условиях методики определения состава триглицеридов, описанной в монографии EP «Sesame oil, refined»

О — олеиновая кислота, П — пальмитиновая кислота, Л — линолевая кислота

определения триглицеридов растительного масла методом ВЭЖХ с использованием рефрактометрического детектора. При хроматографировании масел, содержащих сквален, в условиях методики определения компонентного состава триглицеридов, пик сквалена полностью отделяется до пиков триглицеридов и располагается перед зоной выхода пиков триглицеридов (Рис. 1), что позволяет использовать методику ЕР для количественного определения сквалена совместно с определением состава триглицеридов. Однако, учитывая то, что предназначение методики ЕР — определение состава триглицеридов растительного масла, для чего требуется высокая эффективность хроматографической системы, а задача разрабатываемой методики — количественное определение сквалена, для чего достаточно только разделения хроматографической зоны сквалена от хроматографических зон других компонентов, условия хроматографирования ЕР были изменены в сторону снижения эффективности хроматографической системы. Снижение эффективности было достигнуто за счет уменьшения количества и размера колонок, а также увеличения скорости подвижной фазы до 1.2 мл/мин. При этом время хроматографирования сократилось с 60 мин до 15 мин.

*Материалы и методы*

Для разработки и изучения метрологических характеристик методики применяли жидкостный хроматограф модели LC-10 в комплекте: насос модели LC-10AT, детектор- RID-10, термостат колонок с ручным инжектором Rheodyne 7725i и компьютеризированный интегратор CR-7a Plus.

В качестве стандартного образца использовали сквален («Sigma-Aldrich» США, серия 120M1645V), с заявленным содержанием основного вещества 100 % (GC). Для приготовления модельных растворов сквалена использовали масло подсолнечное рафинированное торговой марки «Олейна». Навески масел и сквалена взвешивали на весах модели AUW220D с неопределенности взвешивания 0.03 мг.

Методика

*Приготовление испытуемого раствора растительного масла*

Около 200 мг (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 8 мл подвижной фазы, перемешивают до полного растворения масла, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Приготовление раствора сравнения сквалена*

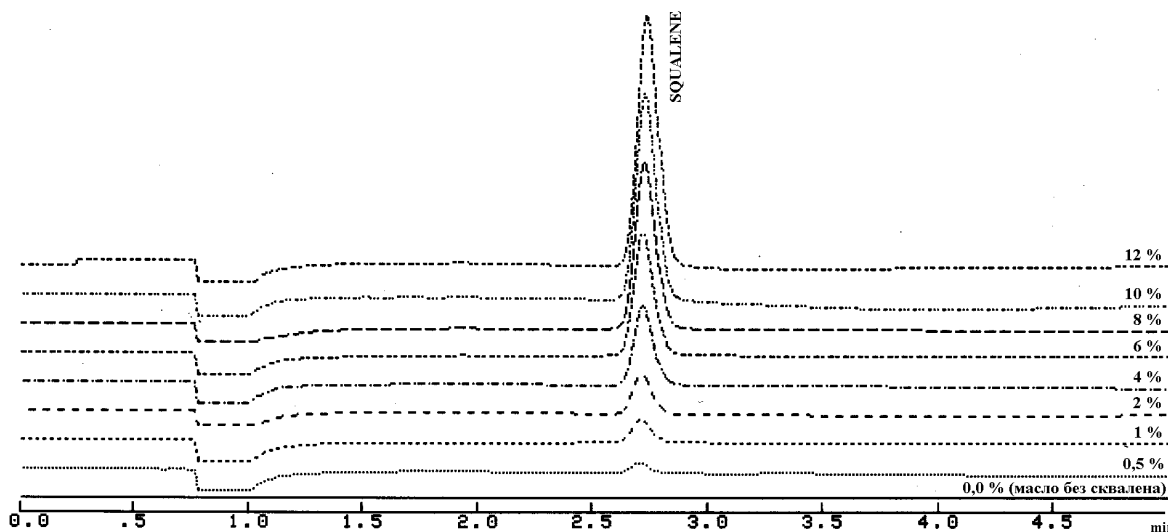
Около 50 мг (точная навеска) стандартного образца сквалена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл подвижной фазы, перемешивают до растворения сквалена, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Условия хроматографирования:

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения сквалена хроматографируют на жидкостном хроматографе с рефрактометрическим детектором в следующих условиях:

- колонка стальная размером 100 мм × 4.0 мм, заполненная сорбентом ReproSil Pur ODS 3, размер частиц 3 мкм;

Рисунок 2



Фрагменты хроматограмм модельных растворов с концентрациями сквалена от 0.5 % до 12 %

- подвижная фаза — дихлорметан — ацетонитрил (1:2);
- скорость подвижной фазы — 1 мл/мин;
- температура колонки — 25 °С;
- температура измерительной ячейки детектора — 30 °С;

Содержание сквалена в растительном масле, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$\frac{S_{sq} \times m_o \times 10 \times 100 \times P}{S_{osq} \times 50 \times m \times 100} = \frac{S_{sq} \times m_o \times P}{S_{osq} \times 5 \times m}$$

где:

$S_{sq}$  — среднее значение площадей пиков сквалена, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_{osq}$  — среднее значение площадей пиков сквалена, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения сквалена;

$m_o$  — масса навески СО сквалена, в миллиграммах;

$m$  — масса навески препарата, в миллиграммах;

$P$  — содержание сквалена в СО, в процентах.

#### Валидация методики

Исследование основных валидационных характеристик методики проводили на модельных образцах, полученных путем добавок навесок сквалена к навескам масла подсолнечного рафинированного, в котором сквален отсутствовал. Модельные растворы готовили с концентрациями сквалена от 0.5 % до 12 % в масле. Этот интервал перекрывает весь возможный

Таблица 1

#### Результаты анализа модельных смесей и их статистическая обработка для количественного определения сквалена

№ модельного раствора	Введено сквалена, %	Найдено сквалена, %	Найдено по отношению к введенному количеству, %
	0.47	0.468407	99.66098
1	0.47	0.465003	98.9369
	0.47	0.464774	98.88816
	1.02	1.01285	99.29902
2	1.02	1.024565	100.4475
	1.02	1.024107	100.4026
	1.93	1.935276	100.2733
3	1.93	1.920845	99.52563
	1.93	1.94362	100.7057
	4.055	4.049305	99.85956
4	4.055	4.069659	100.3615
	4.055	4.063736	100.2154
	5.99	6.037711	100.7965
5	5.99	6.041147	100.8539
	5.99	6.061763	101.198
	8.02	7.963388	99.29411
6	8.02	7.948794	99.11214
	8.02	7.988486	99.60706
	10.1	10.11266	100.1253
7	10.1	10.03655	99.37175
	10.1	10.03141	99.32088
	11.95	12.07747	101.0667
8	11.95	12.0527	100.8594
	11.95	11.87266	99.35281
среднее значение $Z_{cp}$ , %			99.98063
относительное стандартное отклонение, $s_z$ , %			0.714195
относительный доверительный интервал $\Delta \% = t(95 \%, 23) \times S_z = 1.714 \times s_z =$			1.243074
систематическая погрешность $\delta =  Z_{cp} - 100 $			-0.02
критерий незначимости систематической ошибки $\delta \leq \Delta_{As}/3 = 1.6/3 = 0.51$			выполняется



диапазон содержания сквалена в растительных маслах. Критерии приемлемости метрологических характеристик методики рассчитывали как для методик, предназначенных для препаратов с 5 % допуском содержания действующих веществ ( $B = 5\%$ ). Соответственно, суммарная неопределенность методики ( $\Delta_{As}$ ) не должна превышать 1.6 %.

Концентрации сквалена в модельных образцах и результаты определения представлены в Табл. 1. Хроматограммы модельных растворов представлены на Рис. 2.

Как видно из представленных в Табл. 1 данных, систематическая ошибка результатов определения концентрации сквалена в модельных растворах практически отсутствует.

По результатам определения сквалена в модельных растворах, приведенным в Табл. 1, рассчитаны параметры *линейности*. Графики линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества представлены на Рис. 3

Величина свободного члена  $a$  линейной зависимости найденной концентрации сквалена ( $Y$ ) от введенного количества ( $X$ ) должна быть менее своего доверительного интервала ( $\Delta_A$ ). Для данного случая  $t(0.95; n = 24 - 2)$

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n - 2) \times s_a = 2.0737 \times 0.01816 = 0.037$$

Требования к коэффициенту корреляции  $r$  рассчитывают по формуле;

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_Y}\right)^2}$$

где:

$RSD_{rest}$  — остаточное стандартное отклонение,

$RSD_Y$  — стандартное отклонение величин концентраций ( $C_i$ ) исследуемого диапазона.

Стандартное отклонение величин концентраций исследуемого диапазона ( $RSD_Y$ ) рассчитывают по формуле:

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

где:

$g$  — количество точек измерений,

$C_i$  — концентрация сквалена в модельном растворе, в процентах.

Для изучаемого диапазона концентраций сквалена от 0.5 % до 12 % в масле (Табл. 1), и количество точек измерений 24 величина  $RSD_Y$  равна 75.6. Подставляя это значения в формулу расчета предельного значения коэффициента корреляции и принимая значение величины суммарной неопределенности как методик для случаев с 5 % допуском содержания определяемого вещества, ( $\Delta_A = 1.6$ ), получаем, что значение коэффициента корреляции  $r$  должно быть не менее 0.99995, что не соответствует экспериментальным данным. Но если пересчитать значение коэффициента корреляции, отбросив результаты определения самой низ-

Рисунок 3

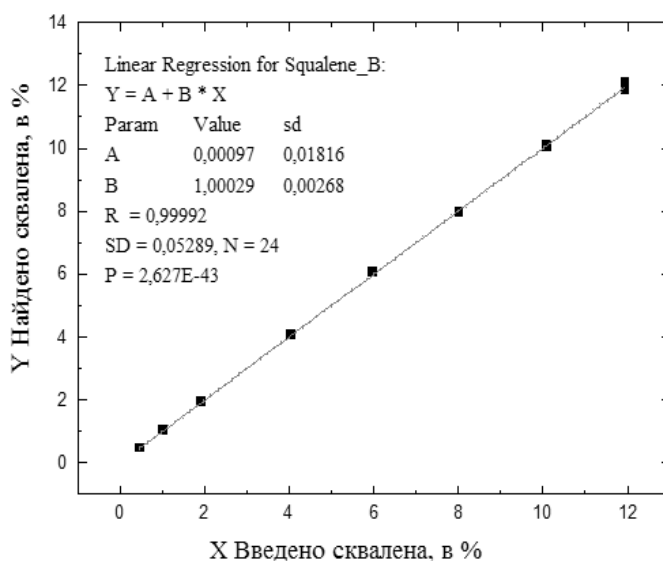


График линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества при определении методом ВЭЖХ

кой концентрации 0.5 %, получается, что значение  $r$  должно быть не менее 0.99992. Таким образом, в диапазоне от 1 % до 12 % методика по показателю *линейность* полностью соответствует требованиям к значению коэффициента корреляции.

Отношение  $RSD_{rest}/b$  не должно превышать величины  $\Delta_{As}/t(p, n)$ , где  $\Delta_{As}$  – максимально допустимая неопределенность методики. Для данного случая  $RSD_{rest}/b < 1.6/1.711 = 0.935$ .

Из представленных в Табл. 2 данных следует, что по показателю *линейность* методика количественного определения сквалена в растительных маслах соответствует требованиям ГФУ к аналитическим методикам для случая 5 % допуска содержания действующего компонента в диапазоне от 1 % до 12 %.

Величина суммарной неопределенности методики ( $\Delta_{As}$ ) складывается из величин неопределенности всех операций пробоподготовки ( $\Delta_{Sp}$ ) и конечной аналитической операции ( $\Delta_{FAO}$ ).

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

Величина неопределенности пробоподготовки складывается из неопределенности взятия навески исследуемого масла – 200 мг (0.1 %), стандартного образца сквалена – 50 мг (0.4 %)

и неопределенности объемов мерных колб вместимостью 10 мл (0.5 %) и 50 мл (0.17 %).

$$(\Delta_{Sp}) = (0.12 + 0.42 + 0.52 \times 0.172)^{1/2} = 0.67 \%$$

Величину конечной аналитической операции рассчитывали по результатам определения концентрации сквалена в образце масла амаранта, полученного путем экстракции из семян хладоном 134а.

Результаты хроматографирования раствора сравнения сквалена и испытуемого раствора масла амаранта приведены в Табл. 3.

Соответственно, суммарное значение неопределенности методики ( $\Delta_{As}$ ) равно 0.962 %.

Таким образом, исследование основных метрологических характеристик методики показывает, что методика количественного определения сквалена в растительных маслах методом ВЭЖХ соответствует требованиям, предъявляемым к методикам количественного определения действующих веществ в лекарственных препаратах в диапазоне концентраций от 1 % до 12 %.

#### Модификация методики

При наличии в комплекте хроматографа дополнительного устройства – 6-ти портового крана, управляемого по программе хроматографа, и хроматографической колонки, предназна-

Таблица 2

#### Метрологические характеристики линейной зависимости для количественного определения сквалена

Параметр	Результат	Критерии приемлемости
$b$	1.00029	–
$S_b$	0.00268	–
$a$	$0.00097 \leq$	0.037 (выполняется)
$S_a$	0.01816	–
$S_r/b$	$0.450 \leq$	0.935 (выполняется)
$S_r$	0.05289	–
$r$	$0.99992 \leq$	0.99992 (выполняется)

Таблица 3

#### Результаты расчета неопределенности конечной аналитической операции

№ измерения	Величина площади пика сквалена ( $S_{sqn}$ )	
	раствор сравнения	испытуемый раствор
1	154044	139831
2	154034	139061
3	154515	139800
4	155061	139786
5	154747	139057
6	154877	139358
7	154063	140519
среднее значение $B_i$	<b>154477.3</b>	<b>139630.3</b>
$RSD, \%$	<b>0.281</b>	<b>0.371</b>
$\Delta_{FAO}, \%$	<b>0.69</b>	

Рисунок 4

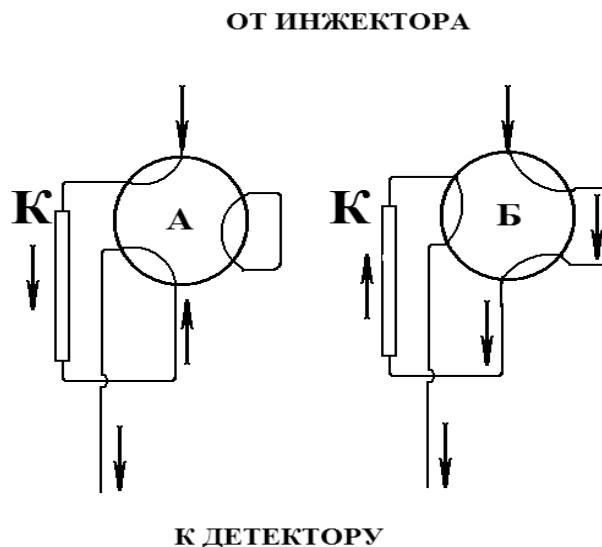


Схема подключения колонки к 6-ти портовому крану

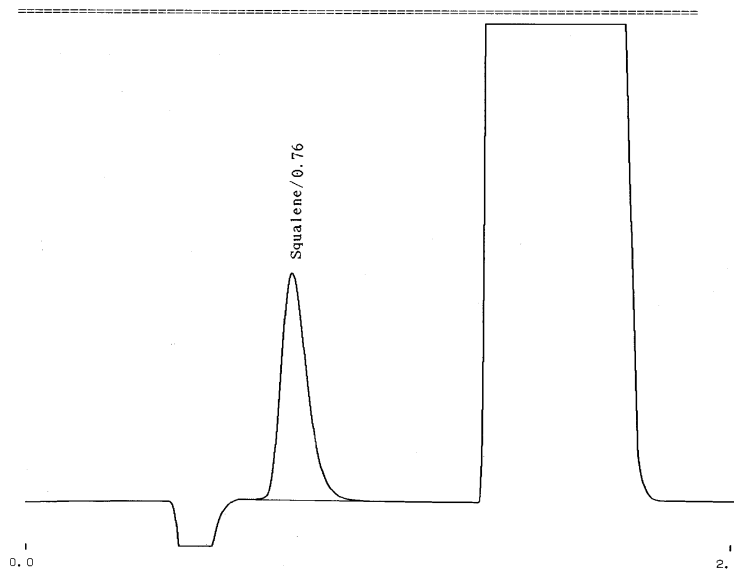
К — колонка

Рисунок 5

C-R7A CHROMATOPAC CH=2 REPORT No.=1 DATA=I:@CHRM2.C01 12/07/05 14:43:34

Analysis File : 1:@FILE2

LC-10vp Shimadzu Co.  
 System : LC-10AT (SN C20973871040); RID-10A  
 Colum : Repros-Sil ODS-4 1,5 mkm 33 mm x 4,6 mm  
 Mob.Phase: Dichlormethane - Acetonitril (1:2)  
 Flou Ret. : 1,2 ml/min  
 L detec. : ;  
 Sampl : Test solution 100 mg/5 ml  
 20 mkl



=====  
 \*\* CALCULATION REPORT \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
2	1	0.76	156991	30377		1	100	Squalene
TOTAL			156991	30377			100	

Хроматограмма испытуемого раствора масла амаранта, полученная в режиме переключение направления подвижной фазы

ченной для проведения «быстрой» хроматографии, время получения одной хроматограммы можно сократить еще почти в 7 раз. При этом состав и скорость подвижной фазы, объем вводимой пробы, температура колонки и режим работы детектора остаются неизменными. На Рис. 4 показана схема подключения колонки, которая обеспечивает удаление из колонки триглицеридов масел промывкой подвижной фазой в реверсивном режиме.

В момент введения испытуемого образца 6-ти портовый кран находится в положении «А». Анализируемая проба попадает в хроматографическую колонку, где сквален отделяется от суммарной хроматографической зоны триглицеридов. После выхода хроматографической зоны сквалена кран переключается в положение «Б» и обратным потоком подвижной фазы компактная суммарная зона триглицеридов элюируется из колонки. Хроматограмма испытуемого раствора масла амаранта, полученная в условиях с переключением потока подвижной фазы представлена на Рис. 5. Переключение крана из положения «А» в положение «Б» проводили после выхода пика сквалена на 60 секунде после ввода пробы.

Для переключения потока подвижной фазы использовали 6-ти портовый кран высокого давления модели FCV-12АН (Shimadzu, Япония). Для разделения хроматографической зоны сквалена от других компонентов масла использовали хроматографическую колонку размером 33 мм × 4.6 мм, с сорбентом ReproSil ODS-4, размер частиц 1.5 мкм, производство фирмы «Dr. Maisch», Германия.

Таким образом, незначительное дополнение, введенное в хроматографическую систему хроматографа, позволило значительно сократить время получения одной хроматограммы, что может быть полезным при регулярном контроле большого количества образцов масел.

#### Выводы

Разработана методика непосредственного определения сквалена в растительных маслах с использованием метода ВЭЖХ и проведены исследования ее метрологических характеристик.

Выбраны условия хроматографирования, обеспечивающие определение сквалена в диа-

пазоне от 1 % до 12 % в маслах с суммарной неопределенностью, не превышающей 1.6 %.

Предложен путь сокращения времени хроматографирования до 2 мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Heikki Relas. Metabolism of squalene in triglyceride-rich lipoproteins in humans / Heikki Relas.- Department of Medicine University of Helsinki, 2001. - 83 p.
2. Зинченко А.А. Определение сквалена в растительных маслах методом газовой хроматографии / А.А. Зинченко // Фармаком. — 2012. - № 3. — С. 82-93.
3. European Pharmacopoeia. — 5<sup>th</sup> ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2005. — 2416 p.
4. Определение сквалена в семенах некоторых растений семейства Amaranthaceae / Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека, И.А. Гостищев, В.Н. Сорокопудов, А.А. Сиротин // Химия природных соединений. - 2008. - № 4. -

#### Резюме

Зинченко О.А., Боброва М.Е.

#### Визначення сквалену в рослинних оліях методом високоефективної рідинної хроматографії

Проведено розробку та вивчено метрологічні характеристики методики якісного та кількісного визначення сквалену в рослинних оліях методом ВЕРХ без попереднього виділення неомілюваного залишку. Показано, що основні валідаційні характеристики методики задовольняють вимогам ДФУ.

*Ключові слова:* сквален, рослинні олії, метод високоефективної рідинної хроматографії, валідація, метрологічні характеристики, Державна Фармакопея України.

#### Summary

Zinchenko A.A., Bobrova M.E.

#### Determination of squalene in vegetable oils by high performance liquid chromatography

Development has been performed and metrological characteristics of qualitative and quantitative determination of squalene in vegetable oils by HPLC without prior isolation of an unsaponifiable residue have been studied. It was shown that the main validation indices of method satisfied the requirements of the SPU.

*Key words:* squalene, vegetable oils, high performance liquid chromatography, validation, metrological characteristics, State Pharmacopoeia of Ukraine.

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

**Боброва Марина Евгеньевна.** Окончила Государственный педагогический университет им. Г.С. Сковороды (2004) и Национальный фармацевтический университет (2009). Мл. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП «Украинский научный фармакопейный центра качества лекарственных средств».

## Екстемпоральні лікарські засоби

УДК 615.07:543.452

Євтіфєєва О.А.

Національний фармацевтичний університет

### Валідація методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного виготовлення

Уперше проведено валідацію методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного виготовлення й оцінку зміни фактору приросту показника заломлення у межах діапазону застосування методики. За результатами встановлено, що застосування методу рефрактометрії в умовах аптеки для контролю якості концентрованих водних розчинів відповідно до сучасних вимог можливе за умови або розширення допусків вмісту діючої речовини до  $\pm 10.00\%$  або підвищення вимог до приладового обладнання та припустимої похибки вимірювання показника заломлення не гірше  $n_D = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ .

**Ключові слова:** рефрактометрія, концентрований розчин, екстемпоральні лікарські засоби, кількісне визначення, валідація.

У практиці фармацевтичного аналізу метод рефрактометрії широко застосовується для контролю якості концентрованих розчинів, внутрішньоаптечних заготовок та екстемпоральних лікарських форм (ЕЛФ), виготовлених про запас [1-3].

Метою даної роботи є практичне визначення та оцінка валідаційних характеристик рефрактометричного кількісного визначення концентрованих водних розчинів аптечного виготовлення відповідно до вимог ДФУ [4].

#### 1. Критерії оцінки придатності валідаційних характеристик

Згідно з вимогами ДФУ відхилення, допустимі в масі окремих інгредієнтів у концентрованих розчинах, звичайно складають не більше  $B = \pm 5.00\%$  від зазначеної концентрації [4], за Наказом МОЗ України № 626 (далі – Правилами) [5], допуски регламентуються інакше: до  $20.00\%$   $B = \pm 2.00\%$ ; більше  $20.00\%$   $B = \pm 1.00\%$ . Враховуючи вимоги, регламентовані цими нормативними документами, критерії прийнятності

Таблиця 1

#### Критерії прийнятності валідаційних характеристик

Критерії прийнятності валідаційних характеристик	Величини критичних значень, %			
	допуски за Правилами		допуски за ДФУ	
допуски вмісту	<20: $\pm 2.00$	>20: $\pm 1.00$	$\pm 5.00$	$\pm 10.00$
$\max \Delta_{As}$	0.64	0.32	1.60	3.20
$\max \delta$	0.20	0.10	0.51	1.02
$RSD_0, \%$	0.36	0.18	0.90	1.81
$R_c$	0.9997	0.9999	0.9981	0.9924
$a$	1.02	0.51	2.56	5.12

Таблиця 2

#### Порівняльна характеристика довідкової величини фактору приросту

Розчин	Величина фактора $F$		
	Кулешова [7]	Сенов [8]	Перельман [9]
натрію гідрокарбонату 5.00 %	0.00125	0.00125	–
натрію бензоату 10.00 %	0.00214	0.00208	0.00208
натрію броміду 20.00 %	0.00130	0.00132	0.00132
калію броміду 20.00 %	0.00116	0.00114	0.00114
калію йодиду 20.00 %	0.00130	0.00128	0.00128
кофеїну натрію бензоату 5.00 %	0.00192	0.00192	0.00192
кофеїну натрію бензоату 20.00 %	0.00192	–	–
хлоральгідрату 10.00 %	0.00113	0.00113	0.00113
хлоральгідрату 20.00 %	0.00113	0.00113	0.00113
натрію саліцилату 40.00 %	0.00200	–	–

для кількісного визначення для допусків вмісту  $\pm 1.00\%$ ;  $\pm 2.00\%$ ;  $\pm 5.00\%$  та  $\pm 10.00\%$  наведені в Табл. 1 [6].

### 2. Фактор приросту показника заломлення ( $F$ )

Аналіз рефрактометричних таблиць довідкових видань [7-9] показав, що для деяких розчинів існують розбіжності величин фактора приросту показника заломлення  $F$  (Табл. 2).

Залежність показника заломлення розчину від концентрації (вагова або об'ємна) встановлюється дослідним шляхом для кожної окремої речовини. Зазначимо, що  $F$  для багатьох лікарських речовин не є величиною постійною при зміні концентрації. Для таких речовин постійним значення  $F$  є у певних межах концентрацій [7-9].

Із метою застосування методу рефрактометрії для аналізу якості концентрованих розчинів їх можна класифікувати як розчини, фактор показника заломлення яких не залежить від концентрації, та розчини, фактор показника заломлення яких залежить від концентрації.

### 3. Експериментальна частина

Приготування модельних розчинів проводили масо-об'ємним способом за допомогою мірного посуду класу А, та аналітичних ваг АВ 204 S/A Mettler Toledo. Рефрактометричне визначення проводили в умовах двох лабораторій, де для аналізу використовували рефрактометричне обладнання, що найбільш розповсю-

джене серед виробничих аптек. У лабораторії № 1 вимірювання проводили на рефрактометрії RL3 (похибка показника заломлення дорівнює  $n_D^{20} = \pm 2.0 \times 10^{-4}$ ), у лабораторії № 2 — рефрактометрії УРЛ-1 (похибка показника заломлення дорівнює  $n_D^{20} = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ ). Прилади характеризуються шкалою показника заломлення від 1.3 до 1.7; поділка шкали дорівнює 0.001; точність визначення не перевищує мінімальні вимоги ДФУ до похибки вимірювання показника заломлення —  $\pm 2.0 \times 10^{-4}$  [4]. Калібрування приладів проводили водою очищеною [10]. Для кожного модельного розчину визначення проводили тричі. Перед проведенням вимірювання воду очищену, досліджуваний і модельні розчини витримували у термостаті при температурі  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  із метою доведення до заданої температури. Валідаційні характеристики досліджували на мінімальному діапазоні застосування — від 80 % до 120 %. Специфічність забезпечували попереднім проведенням тестів на ідентифікацію лікарських речовин за методиками ДФУ.

#### 3.1. Вибір об'єктів дослідження

Для випробування обрали найбільш застосовувані в аптечній практиці концентровані розчини у діапазоні концентрацій від 5.00 % до 40.00 %: натрію гідрокарбонату 5.00 %; натрію бензоату 10.00 %; натрію броміду 20.00 %; калію броміду 20.00 %; калію йодиду 20.00 %; кофеїну натрію бензоату 5.00 %, 20.00 %; хлоральгідрату 10.00 %, 20.00 %; натрію саліцилату 40.00 %.

Таблиця 3

#### Оцінка зміни приросту показника заломлення $\Delta F$

Найменування розчину	Середнє $F$	Стандартне відхилення, $S_F$	Довірчий інтервал $\Delta as$ , $\% = t(95\%, 11) \times S_F$	Критичне значення для невизначеності зміни $\Delta F$ (ДФУ)	Вплив зміни $\Delta F$ на загальну невизначеність аналізу
розчин натрію бензоату 10.00 %	0.0021	$3.0 \times 10^{-6}$	$6.16 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 6.16 \times 10^{-6}$	незначущий
розчин натрію броміду 20.00 %	0.0013	$2.0 \times 10^{-6}$	$4.15 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 4.15 \times 10^{-6}$	незначущий
розчин калію броміду 20.00 %	0.0011	$2.0 \times 10^{-6}$	$3.57 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 3.57 \times 10^{-6}$	незначущий
розчин калію йодиду 20.00 %	0.0013	$4.1 \times 10^{-5}$	$7.52 \times 10^{-5}$	$6.4 \times 10^{-5} \leq 7.52 \times 10^{-5}$	значущий
розчин хлоральгідрату 10.00 %	0.0011	$2.9 \times 10^{-5}$	$5.93 \times 10^{-5}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 5.93 \times 10^{-5}$	незначущий
розчин хлоральгідрату 20.00 %	0.0011	$2.0 \times 10^{-6}$	$4.34 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 4.34 \times 10^{-6}$	незначущий
розчин кофеїну натрію бензоату 5.00 %	0.0019	$3.0 \times 10^{-5}$	$5.56 \times 10^{-5}$	$6.4 \times 10^{-5} \geq 5.56 \times 10^{-5}$	незначущий

Таблиця 4

Валідаційні характеристики методик рефрактометричного визначення

Валідаційні характеристики, (%)	Статистично обчислені результати експерименту (%)		Критерії прийнятності (%) відповідно до		
	лаб. 1	лаб. 2	Правила	ДФУ	
<i>розчин натрію гідрокарбонату 5.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	98.24	101.00	±2	±5	±10
лінійність	-1.35±1.35	0.39±0.85	$a \leq 1.02$	$a \leq 2.56$	$a \leq 5.12$
	1.42	0.89	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9989	0.9996	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	4.58	2.36	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	3.32	1.65			
правильність	1.70	-1.06	$\delta_z \leq 0.20$	$\delta_z \leq 0.51$	$\delta_z \leq 1.02$
міжлабораторна $\delta$	0.38				
відтворюваність	2.08		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
довірчий інтервал	±3.47				
<i>розчин кофеїну натрію бензоату 5.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	98.47	100.01	±2	±5	±10
лінійність	-0.71±1.71	-0.75±1.11	$a \leq 1.02$	$a \leq 2.56$	$a \leq 5.12$
	1.78	1.16	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9982	0.9993	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	2.98	1.54	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	2.82	1.97			
правильність	1.83	0.29	$\delta_z \leq 0.20$	$\delta_z \leq 0.51$	$\delta_z \leq 1.02$
міжлабораторна $\delta$	1.10				
відтворюваність	1.61		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
довірчий інтервал	±2.74				
<i>розчин хлоральгідрату 10.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	100.56	100.12	±2	±5	±10
лінійність	5.56±2.63	1.26±1.63	$a \leq 1.02$	$a \leq 2.56$	$a \leq 5.12$
	1.45	0.90	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9952	0.9983	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	2.53	1.31	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	2.84	1.54			
правильність	-0.18	0.26	$\delta_z \leq 0.20$	$\delta_z \leq 0.51$	$\delta_z \leq 1.02$
міжлабораторна $\delta$	0.06				
відтворюваність	1.31		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
довірчий інтервал	±2.23				
<i>розчин калію броміду 20.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	100.03	100.92	±2	±5	±10
лінійність	0.66±0.82	0.59±0.93	$a \leq 1.02$	$a \leq 2.56$	$a \leq 5.12$
	0.82	0.51	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9986	0.9995	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	1.25	0.65	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	1.43	0.83			
правильність	0.30	-0.59	$\delta_z \leq 0.20$	$\delta_z \leq 0.51$	$\delta_z \leq 1.02$
міжлабораторна $\delta$	0.15				
відтворюваність	0.81		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
довірчий інтервал	±1.38				

Таблиця 4 (продовження)

Валідаційні характеристики, (%)	Статистично обчислені результати експерименту (%)		Критерії прийнятності (%) відповідно до		
	лаб. 1	лаб. 2	Правила	ДФУ	
<i>розчин калію йодиду 20.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	98.86	99.12	±2	±5	±10
лінійність	-2.11±1.53	-1.71±0.86	$\alpha \leq 1.02$	$\alpha \leq 2.56$	$\alpha \leq 5.12$
	0.83	0.45	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9985	0.9995	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	1.10	0.57	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	1.46	0.89	$\delta_Z \leq 0.20$	$\delta_Z \leq 0.51$	$\delta_Z \leq 1.02$
правильність	0.86	0.60			
міжлабораторна $\delta$	0.73		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
відтворюваність	0.71				
довірчий інтервал	±1.21				
<i>розчин кофеїну натрію бензоату 20.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	100.38	98.67	±2	±5	±10
лінійність	-1.21±1.15	0.21±0.70	$\alpha \leq 1.02$	$\alpha \leq 2.56$	$\alpha \leq 5.12$
	0.64	0.39	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9992	0.9997	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	0.74	0.38	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	1.20	0.69	$\delta_Z \leq 0.20$	$\delta_Z \leq 0.51$	$\delta_Z \leq 1.02$
правильність	-0.27	1.44			
міжлабораторна $\delta$	0.59		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
відтворюваність	1.05				
довірчий інтервал	±1.78				
<i>розчин хлоральгірату 20.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	100.99	99.70	±2	±5	±10
лінійність	3.16±1.01	-1.78±1.01	$\alpha \leq 1.02$	$\alpha \leq 2.56$	$\alpha \leq 5.12$
	0.55	0.49	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9993	0.9995	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	1.27	0.65	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	1.38	0.98	$\delta_Z \leq 0.20$	$\delta_Z \leq 0.51$	$\delta_Z \leq 1.02$
правильність	-0.94	0.35			
міжлабораторна $\delta$	0.30		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
відтворюваність	0.95				
довірчий інтервал	±1.61				
<i>розчин натрію саліцилату 40.00 %</i>					
			допуски відповідно до (%)		
середнє	100.10	99.97	±2	±5	±10
лінійність	1.88±1.26	0.83±1.03	$\alpha \leq 1.02$	$\alpha \leq 2.56$	$\alpha \leq 5.12$
	0.67	0.56	$S_0 \leq RSD_0 = 0.36$	$S_0 \leq RSD_0 = 0.90$	$S_0 \leq RSD_0 = 1.81$
	0.9989	0.9993	$R_c \geq 0.9997$	$R_c \geq 0.9981$	$R_c \geq 0.9924$
повна невизначеність	0.36	0.18	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.640$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
збіжність	1.18	0.96	$\delta_Z \leq 0.20$	$\delta_Z \leq 0.51$	$\delta_Z \leq 1.02$
правильність	-0.03	0.11			
міжлабораторна $\delta$	0.04		$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 0.64$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 1.60$	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3.20$
відтворюваність	0.62				
довірчий інтервал	±1.05				



3.2. Оцінка F

Для випробовуваних розчинів, в яких фактор приросту показника заломлення залежить від концентрації, попередньо оцінювали [4] зміну фактора приросту  $\Delta F$  у межах застосування методики. Результати наведено в Табл. 3.

Відповідно до ДФУ різниця між значенням показника заломлення модельних розчинів однієї серії випробовуваного розчину не має перевищувати похибку  $2.0 \times 10^{-4}$ . За таких вимог до похибки вимірювання приладу зміна  $\Delta F$  у межах діапазону застосування методики (від 80.00 % до 120.00 %) не виявляє значущого впливу на кінцевий результат аналізу, якщо виконується нерівність:  $(2.0 \times 10^{-4}) \times 0.32 = 6.4 \times 10^{-5} \geq \Delta F_{80-120}$  [3]. Отримані результати доводять, що для всіх випробовуваних розчинів, окрім розчину калію йодиду 20.00 %, невизначеність зміни фактора приросту при зміні концентрації речовини у межах діапазону застосування методики значуще не впливає на результат рефрактометричного визначення.

3.3. Визначення валідаційних характеристик

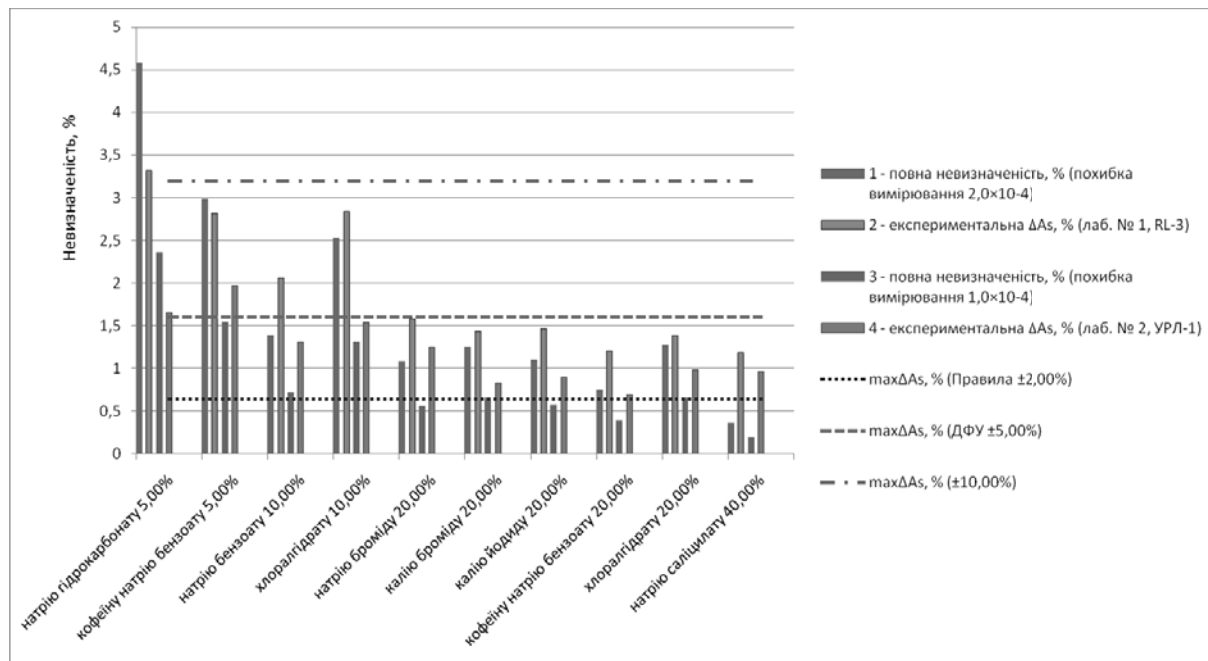
Вивчення параметрів лінійності, правильності, збіжності на всьому діапазоні застосування методики проводили відповідно до стандартизованої процедури [6]. Статистично обчислені експериментальні дані наведено в Табл. 4.

Графічну оцінку експериментально отриманих результатів кількісного визначення для кожного розчину наведено на Рис. 1. По осі x позначено перелік концентрованих розчинів, що використовувалися при дослідженні параметрів рефрактометричного визначення. По осі y, у відсотках, наведено результати, отримані в кожній лабораторії на обладнанні різної точності вимірювання, критичне значення максимально припустимої невизначеності результатів аналізу відповідно до Правил і ДФУ ( $\pm 5.00\%$ ;  $\pm 10.00\%$ ).

Результати дозволяють зробити висновок, що довірчий інтервал методики аналізу не перевищує значення теоретично прогнозованої невизначеності для розчинів натрію гідрокарбонату 5.00 % і кофеїну натрію бензоату 5.00 %, для інших розчинів практична невизначеність результатів аналізу дещо перевищує прогнозоване значення невизначеності аналізу, незалежно від точності вимірювання приладового обладнання [3].

Практична невизначеність результатів аналізу при точності вимірювання приладу  $1.0 \times 10^{-4}$  хоча й перевищує прогнозоване значення невизначеності аналізу, але при допусках вмісту  $\pm 10.00\%$  для 5.00 % випробовуваних розчинів і для всіх інших розчинів при допусках вмісту  $\pm 5.00\%$  дозволяє рекомендувати застосування методу рефрактометрії для контролю якості.

Рисунок 1

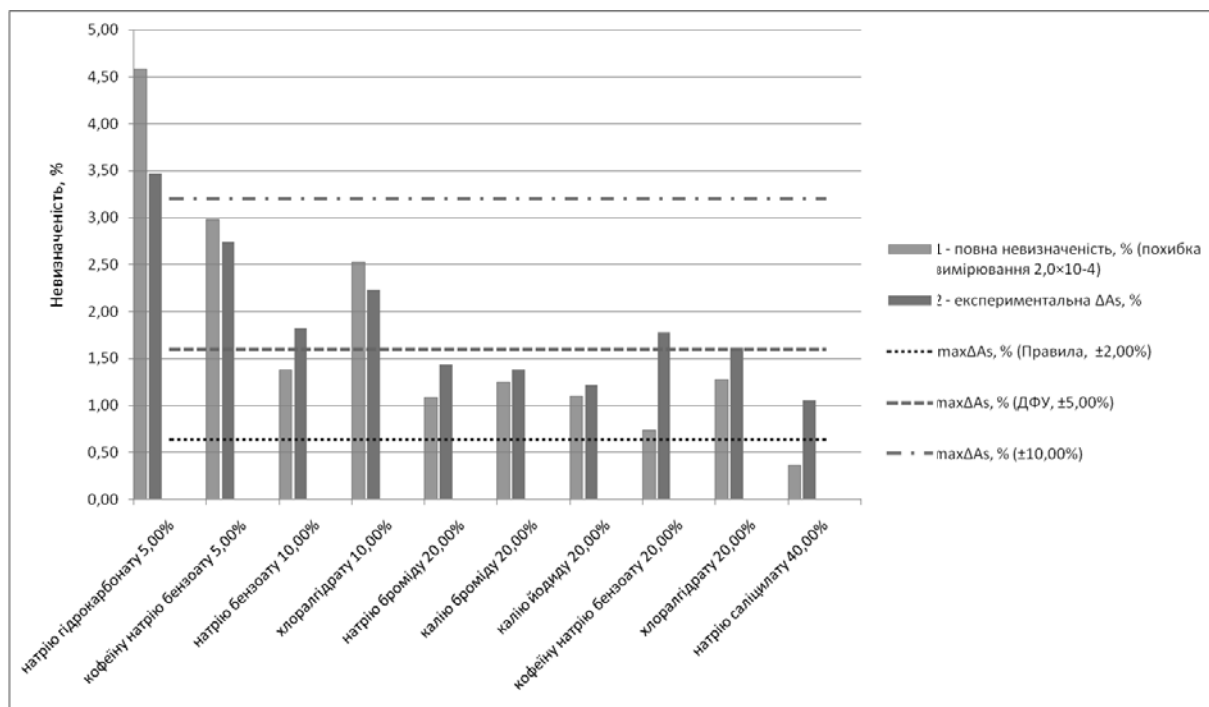


Оцінка експериментально одержаної невизначеності результатів рефрактометричного визначення концентрованих розчинів в умовах двох лабораторій на приладах із різною похибкою вимірювання  $2.0 \times 10^{-4}$ ;  $1.0 \times 10^{-4}$

На Рис. 2 наведено графічну оцінку відтворюваності результатів рефрактометричного визначення для кожного розчину в умовах двох лабораторій. По осі x позначено перелік досліджуваних концентрованих розчинів. По

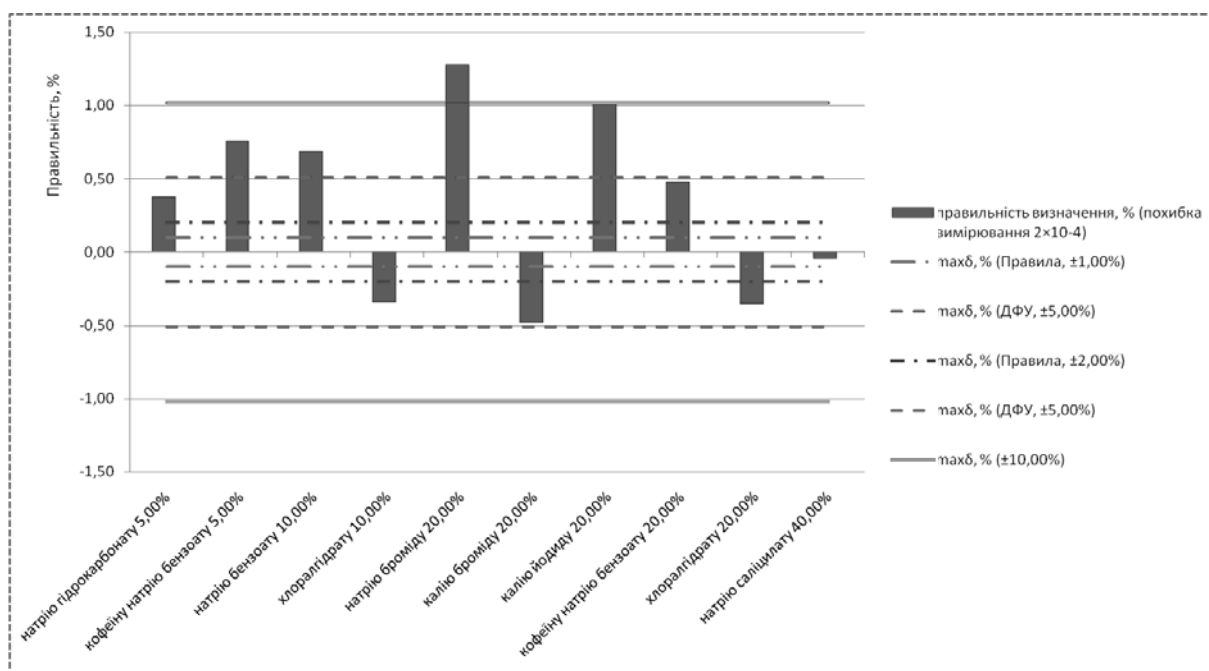
осі y, у відсотках, наведено загальні результати відтворюваності та критичне значення максимально припустимої невизначеності результатів аналізу для допусків вмісту  $\pm 5.00\%$ ;  $\pm 10.00\%$ ;  $\pm 15.00\%$ .

Рисунок 2



**Практична невизначеність кількісного визначення компонентів у складі концентрованих розчинів за результатами, отриманими двома лабораторіями**

Рисунок 3



**Правильність результатів рефрактометричного визначення компонентів у складі концентрованих розчинів за результатами, одержаними двома лабораторіями**

Результати доводять, що при регламентованій ДФУ точності вимірювання показника заломлення (не гірше  $2.0 \times 10^{-4}$ ) для контролю якості концентрованих розчинів, виготовлених масо-об'ємним способом, метод рефрактометрії можна рекомендувати для розчинів із концентрацією 20.00 % лише при допусках вмісту  $\pm 5.00$  %, для розчинів із концентрацією  $\pm 10.00$  % - при допусках вмісту  $\pm 5.00$  %, для розчинів із концентрацією  $\pm 5.00$  % - при допусках вмісту  $\pm 15.00$  %.

Графічну оцінку правильності рефрактометричного визначення за результатами, отриманими в двох лабораторіях, наведено на Рис. 3. По осі x позначено перелік концентрованих розчинів, що використовувалися при дослідженні параметрів рефрактометричного визначення. По осі y, у відсотках, наведено експериментально отримані середні значення для кожного розчину, критичне значення максимально припустимої систематичної похибки результатів аналізу відповідно до Правил ДФУ ( $\pm 5.00$  %;  $\pm 10.00$  %).

Результати показали, що вимогам Правил ( $\pm 1.00$  %) відповідає розчин натрію саліцилату 40.00 %, інші розчини за показником правильності не відповідають вимогам Правил ( $\pm 2.00$  %); вимогам ДФУ для допусків вмісту  $\pm 5.00$  % відповідають 5 розчинів (натрію гідрокарбонату 5.00 %, хлоральгідрату 10.00 %, калію броміду 20.00 %, кофеїну натрію бензоату 20.00 %, хлоральгідрату 20.00 %); інші розчини (кофеїну натрію бензоату 5.00 %, натрію бензоату 10.00 %, натрію броміду 20.00 %, калію йодиду 20.00 %) відповідають вимогам для допусків вмісту  $\pm 10.00$  %. Для розчинів натрію броміду 20.00 % і калію йодиду 20.00 % спостерігається невідповідність між досить прийнятними показниками прецизійності (не перевищують критичне значення для допусків вмісту  $\pm 5.00$  %) і завищеними показниками середнього – відповідає вимогам для допусків вмісту  $\pm 10.00$  %.

Оцінка валідаційних характеристик методики кількісного рефрактометричного визначення дозволяє зробити висновок, що застосування методу рефрактометрії в умовах аптеки для контролю якості концентрованих водних розчинів відповідно до сучасних вимог можливе за умови або розширення допусків вмісту діючої речовини до  $\pm 10.00$  %, або підвищення вимог до приладового обладнання та припустимої похибки вимірювання показника заломлення не гірше ніж  $n_D = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ .

## Висновки

Уперше в умовах двох лабораторій на рефрактометрах із різною похибкою вимірювання показника заломлення проведено валідацію методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного виготовлення.

Уперше проведено оцінку зміни фактора приросту  $\Delta F$  у межах діапазону застосування методик. Встановлено, що для всіх випробуваних розчинів, крім розчину калію йодиду 20.00 %, при зміні концентрації у межах діапазону застосування невизначеність фактора приросту значуще не впливає на результат аналізу при похибці вимірювання приладу не гірше  $2.0 \times 10^{-4}$  (вимоги ДФУ).

Встановлено, що застосування методу рефрактометрії в умовах аптеки для контролю якості концентрованих водних розчинів відповідно до сучасних вимог можливе за умови або розширення допусків вмісту діючої речовини для 5.00 % розчинів до  $\pm 15.00$  %, для 10.00 % розчинів і вище до  $\pm 10.00$  %, або підвищення вимог до приладового обладнання та припустимої похибки вимірювання показника заломлення не гірше  $n_D = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ .

## ЛІТЕРАТУРА

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек / За ред. проф. О. І. Тихонова, проф. Т. Г. Ярних. – К.: МОЗ України, 2005. – 98 с.
2. Євтіфеева О.А. Використання рефрактометричного методу для оцінки якості рідких лікарських форм аптечного виготовлення / О.А. Євтіфеева, О.В. Ганева // Фармац. журн. – 2010. – № 6. – С. 72-77.
3. Теоретична оцінка повної невизначеності методик рефрактометричного кількісного визначення та аналіз факторів, що на неї впливають / О.А. Євтіфеева, К.І. Проскуріна, О.А. Здорик, О.Г. Присіч // Фармаком. – 2012. - № 1/2. – С. 63-71.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: PIPEG, 2001. – 556 с. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с. - Доповнення 2. - 2008. – 620 с.
5. Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. «Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» // Юридичні аспекти фармації. – Харків, 2006. – Т. 3. – С. 49-59.
6. Евтифеева О.А. Стандартизованная процедура валідації методик количественного определения экстенпоруальных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О.А. Евтифеева, В.А. Георгиянц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.
7. Кулешова М.И. Анализ лекарственных форм, изготавливаемых в аптеках / М.И. Кулешова, Л.Н. Гусева, О.К. Сивецкая. – М.: Медицина, 1989. – 228 с.
8. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии / Под ред. П.Л. Сенова. – М.: Медицина, 1978. – 360 с.
9. Перельман Я.М. Анализ лекарственных форм / Я.М. Перельман. – М.: Медгиз. – 1961. – 616 с.
10. Аттестация тестовых образцов раствора глюкозы 5 % для инфузий для количественного определения глюкозы методом рефрактометрии / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.Н. Архипова и др. // Фармаком. – 2005. – № 1. – С. 28-38.

## Резюме

Евтифеева О.А.

**Валидація методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного приготування**

Вперше проведена валидація методик рефрактометричного кількісного визначення для серії концентрованих розчинів аптечного приготування і оцінка змінення фактора прироста показателя преломлення в рамках мінімального діапазона застосування методик. По результатам встановлено, що застосування методу рефрактометрії в умовах аптеки для контролю якості приготування концентрованих водних розчинів в відповідності з сучасними вимогами можливо при умови або розширення допусків вмісту діючої речовини до  $\pm 10.00\%$ , або підвищення вимог до обладнання і допустимої помилки вимірювання показателя преломлення не гірше  $n_D = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ .

**Ключові слова:** рефрактометрія, концентровані розчини, екстемпоральні лікарські засоби, валидація.

## Summary

Ievtifieieva O.A.

**Validation of refractometric quantitative determination of series of concentrated solutions of pharmaceutical preparation**

For the first time a validation of techniques of refractometric assay for a series of concentrated solutions of pharmaceutical preparation and evaluation of alterations of the factor of increase the refractive index within a range of application of techniques have been conducted. According to obtained data, an application of refractometry in a pharmacy for the quality control of concentrated aqueous solutions up to modern standards has been found to be possible at conditions if extension of the active substance content tolerances to  $\pm 10.00$  per cent or increasing requirements for instrumentation and permissible error of measurement of the refractive index (not less than  $n_D = \pm 1.0 \times 10^{-4}$ ).

**Key words:** refractometry, concentrated solutions, pharmaceutical preparation, assay, validation.

**Євтифеева Ольга Анатоліївна.** Д.фарм.н. (2011). Доцент (2005). Зав. кафедри аналітичної хімії НФаУ (2012).

## Рослинні препарати та їх фармакологічна дія

УДК 615.214.31

Луцак І.В., Штриголь С.Ю., Король А.П.

Національний фармацевтичний університет

Житомирський базовий фармацевтичний коледж ім. Г.С. Протасевича

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

### Морфологічна характеристика адаптогенного ефекту екстракту родіоли рідкого та екстракту кори осики на моделі іммобілізаційного стресу

У досліджах на щурах на моделі хронічного іммобілізаційного стресу (15 діб по 16 год щоденно) екстракт кори осики (1 мг/кг у шлунок протягом періоду іммобілізації) виявляє кардіопротекторний ефект, попереджаючи розвиток дистрофії та вогнищ некрозу серцевого м'язу, зменшуючи порушення стану мікроциркуляторного русла, забезпечуючи ендотеліопротекторний ефект, а також зменшує деструктивні зміни у скелетних м'язових волокнах, сприяє проліферації міосателіоцитів і гіпертрофії м'язових волокон. За вираженістю захисного впливу на серце та скелетні м'язи екстракт кори осики не поступається класичному фітоадаптогену — екстракту родіоли рідкого (1 мл/кг при аналогічному режимі введення).

**Ключові слова:** іммобілізаційний стрес, гістоструктура міокарда та скелетних м'язів, екстракт кори осики, екстракт родіоли рідкий.

Стимуляція адаптаційних можливостей організму є актуальним завданням, оскільки зростає вплив несприятливих умов довкілля, що знижує працездатність і сприяє розвитку хвороб [3]. Більшість адаптогенів — рослинні препарати. Ареалом лікарських рослин із подібними властивостями (женьшень, родіола рожева, елеутерокок тощо.) переважно є Сибір, Далекий Схід, країни Південно-Східної Азії, проте ресурси багатьох видів виснажені [8]. В Україні зазначені вище рослини майже не зустрічаються. Тому необхідний пошук нових видів лікарської рослинної сировини (ЛРС) із адаптогенними властивостями.

Відомим адаптогеном є екстракт родіоли рідкий (ЕРР), у специфічних ефектах якого беруть участь простий фенол тирозол і фенологікозид салідрозид [4, 8, 9]. Ці речовини наявні у корі осики (тополі тремтячої, *Populus tremula* L.) [1], що послужило підставою для з'ясування наявності адаптогенної дії екстракту кори осики (ЕКО). Результати наших попередніх досліджень [5, 6] свідчать, що ЕКО дійсно виявляє виражену адаптогенну дію в умовно ефективній дозі 1 г/кг. Цей фітопрепарат стимулює рухову активність та орієнтовно-дослідницьку поведінку тварин у тесті відкритого поля на рівні ЕРР (але, на відміну від останнього, із седативним

ефектом), збільшує фізичну витривалість у тесті плавання з навантаженням, покращує статичну силову витривалість у тесті вису над водою, зменшує стомлення у тесті повторного плавання, підвищує фізичну витривалість мишей після іммобілізаційного стресу [6]. За окремими проявами адаптогенної дії ЕКО не поступається ЕРР ((1-5) мл/кг) або перевершує його.

Метою даної роботи є порівняльне вивчення впливу ЕКО та ЕРР на морфологічні зміни у міокарді та скелетних м'язах за умов хронічного іммобілізаційного стресу (ХІС).

#### Матеріали та методи

Експерименти виконано на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою (180-200) г. Усі тварини було розподілено на 4 групи по 6 особин. Перша група – інтактні щури. Другу групу контрольної патології (КП) склали тварини, яких піддавали впливу ХІС шляхом іммобілізації у тисних пеналах протягом 16 год щодня протягом 15 діб [2]. Щури третьої та четвертої груп протягом усього періоду ХІС отримували внутрішньошлунково, відповідно, вільний від спирту ЕРР у дозі 1 мл/кг та ЕКО у дозі 1 г/кг. ЕКО отримано на кафедрі фармакогнозії НФаУ під керівництвом проф. В.М. Ковальова за технологією, наведеною в [7]. Тварини групи КП отримували дистильовану воду в еквівалентному об'ємі. Дотримувались методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ і вимог біоетики згідно з Національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових ці-

лей» (Страсбург, 1985). Щурів виводили із експерименту безпосередньо після закінчення іммобілізації. Вилучали серце та чотириголовий м'яз стегна, які фіксували у 10 % нейтральному формаліні, промивали, зневоднювали етиловим спиртом і заливали у парапласт. Готували серії зрізів товщиною (3-5) мкм. Зрізи забарвлювали гематоксиліном-еозином. Використовували світловий мікроскоп Olympus BH-2.

#### Результати досліджень та їх обговорення

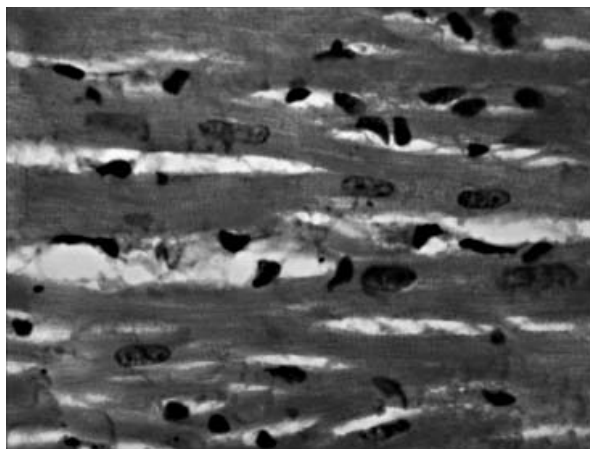
**Серцевий м'яз.** Будова міокарда лівого шлуночка інтактних щурів відповідає даним літератури і складається з кардіоміоцитів і прошарків сполучної тканини, що містить судини та нервові волокна (Рис. 1).

Кардіоміоцити розташовані паралельно, мають однаковий діаметр і форму. У саркоплазмі наявна поперечна посмугованість. Ядра переважно видовженої форми, розташовані у центрі саркоплазми, хроматин добре структурований, просвітлений у центрі та конденсований на периферії. Як правило, ядра містять (1-2) ядерця. Кардіоміоцити з'єднані за допомогою вставних дисків й утворюють систему анастомозуючих волокон. Наявні чисельні кровоносні та лімфатичні судини різного діаметру. Судини мікроциркуляторного русла розташовані паралельно кардіоміоцитам і мають типову для міокарда будову. Навколо судин і між кардіоміоцитами розташовані прошарки сполучної тканини, до складу якої входять поодинокі клітинні елементи (переважно фіброцити, адвентіційні клітини), а також колагенові волокна.

У щурів групи КП загальний план структури міокарда подібний до такого в інтактних тварин. Але наявні зміни з боку мікроциркуляторних судин, стромі та паренхіми. На відміну від міокарда інтактних тварин, мають місце гіпотрофовані клітини із сферичними ядрами, кардіоміоцити з осередковим лізисом міофібрил. Саркоплазма забарвлена неоднорідно, поперечна посмугованість спостерігається не у всіх кардіоміоцитах. Ядра у більшості з них видовжені, хроматин добре структурований, наявні (1-2) ядерця. Трапляються кардіоміоцити з гіперхромними ядрами, хроматин в яких конденсований. Виявляються вогнища некрозу кардіоміоцитів. У таких ділянках виражена гіперплазія фіброblastів і колагенових волокон, гістіолімфоцитарна інфільтрація (Рис. 2).

Як правило, навколо вогнищ некрозу розташовані гіпертрофовані кардіоміоцити, ядра яких мають сферичну форму, світлі, із добре вираженими ядерцями. Інтерстиціальна строма розпушена, набрякла, що підкреслює повздовжню посмугованість міокарда. Вогнищево ви-

Рисунок 1



**Фрагмент міокарда інтактного щура**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ .  
Нормальна гістоструктура: кардіоміоцити;  
фіброblastи; кровоносні капіляри.

являються ділянки перескорочених кардіоміоцитів із гіпертрофією та гіперплазією фібробластів і колагенових волокон (Рис. 3), а також гістіолімфоцитарна інфільтрація.

Спостерігаються суттєві зміни мікроциркуляторного русла. В артеріолах наявні пристінкові тромби. Ендотеліальна вистелка у деяких артеріолах не є суцільною. Стінки артеріол потовщені порівняно з такими в інтактних тварин. Трапляються набряк інтими, гіпертрофія та гіперплазія гладких міоцитів у медії та фібробластів в адвентиціальній оболонці, навколо артеріол — набряк інтерстиціальної тканини. Просвіти венул розширені та повнокровні, у де-

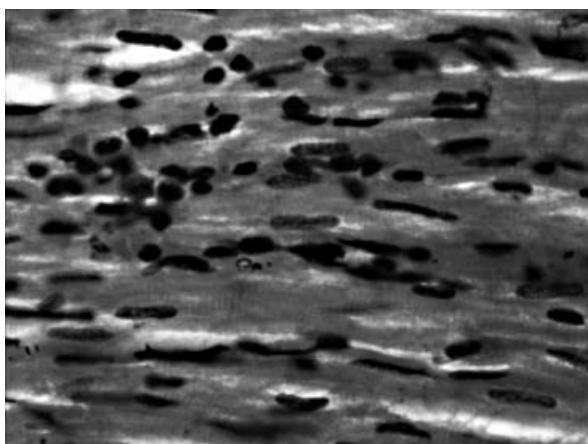
яких відмічається крайове стояння лейкоцитів та їх діapedез. Навколо венул має місце набряк інтерстицію та гістіолімфоцитарна інфільтрація. Просвіти гемокапілярів нерівномірно розширенні, заповнені форменими елементами крові, наявні ділянки складжу еритроцитів (Рис. 3). В ендотеліоцитах цитоплазма має ознаки набряку, ядра пікноморфні та часто виступають у просвіт судин. Ендотеліоцити у стінках капілярів не утворюють суцільного шару. Базальна мембрана місцями розпушена, зруйнована. Виявляються діapedезні крововиливи навколо капілярів і набряк інтерстицію.

Отже, у тварин, яких піддавали впливу ХІС, часто спостерігаються вакуольна та жирова дистрофії, міоцитолізис і ділянки некрозу міокардіоцитів, в яких виражена гістіолімфоцитарна інфільтрація, а також порушення мікроциркуляції. Остання виявляється пристінковими тромбами у просвітах артеріол, дистрофічними змінами в ендотеліоцитах, гіперплазією лейомиоцитів у середній оболонці стінок артеріол, венозним повнокрів'ям і підсиленням діapedезом лейкоцитів крізь стінки венул, дистрофією цитоплазми ендотеліоцитів у стінках кровоносних капілярів, порушенням цілісності ендотеліального пласта в капілярах, деструктивними змінами в їх базальних мембранах, набряком інтерстицію простору та лейкоцитарною інфільтрацією, вираженішою навколо венул.

При застосуванні ЕРР для корекції гіпокінезії патологічні зміни у структурі міокарда менш виражені. Волокна за структурою не відрізняються від таких у інтактних тварин. Подекуди у кардіоміоцитах відсутня поперечна посмугованість. Наявні ділянки перескорочених кардіоміоцитів, однак вони значно менших розмірів, ніж у тварин групи КП. Мають місце ділянки міокарда з осередковою альтерацією кардіоміоцитів, однак їхній розмір незначний і трапляються вони набагато рідше, ніж у групі КП. Ділянки некрозу кардіоміоцитів містять, як правило, одну клітину та виявляються не у всіх полях зору (Рис. 4.).

Ядра у більшій частині кардіоміоцитів видовженої форми з добре структурованим хроматином і ядерцями. Однак подекуди спостерігаються кардіоміоцити з гіперхромними, пікноморфними ядрами з невираженою структурою хроматину та відсутністю ядерця. Навколо таких ядер наявний перинуклеарний набряк саркоплазми. У більшій частині кардіоміоцитів поперечна посмугованість збережена, навколо вогнищ некротично змінених кардіоміоцитів розташовані гіпертрофовані кардіоміоцити. Ядра останніх сферичної та видовженої фор-

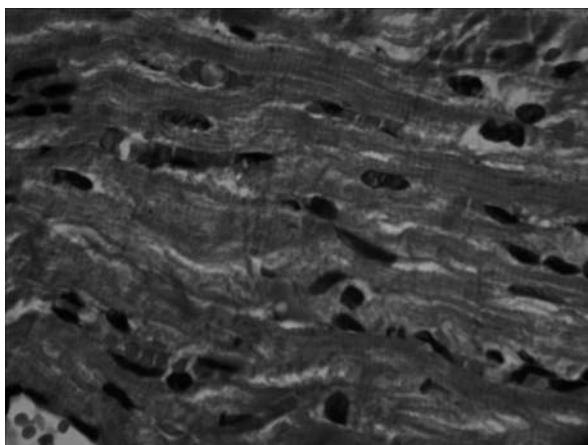
Рисунок 2



Фрагмент міокарда щура на 15-у добу гіпокінезії

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ . Вогнищевий некроз кардіоміоцитів; гістіолімфоцитарна інфільтрація; венозне повнокрів'я.

Рисунок 3



Фрагмент міокарда щура на 15-й добу гіпокінезії

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ . Перескорочені кардіоміоцити; вакуольна дистрофія кардіоміоцитів; складжі еритроцитів у кровоносних капілярах.

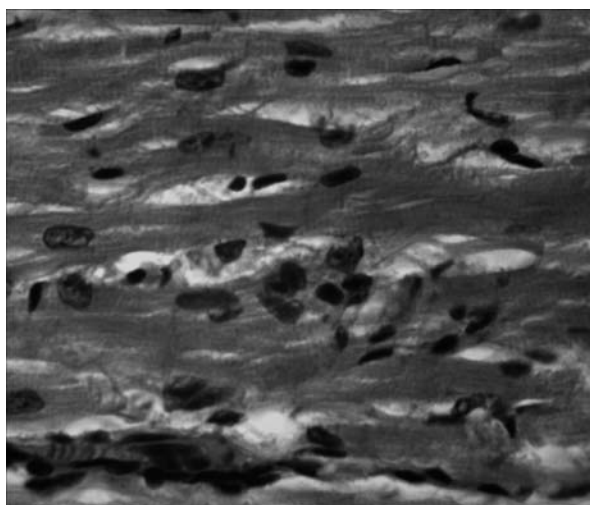
ми, світлі, містять добре структуровані ядерця. Подекуди наявні осередки кардіоміоцитів із вакуольною дистрофією цитоплазми, помірного набряку та розшарування кардіоміоцитів із гомогенізацією цитоплазми.

Судини мікроциркуляторного русла міокарда помірно повнокровні. Просвіти артеріол не звужені, пристінкові тромби в них відсутні. Ендотеліальна вистелка артеріол суцільна. Гіпертрофія гладких міоцитів у стінках артеріол не виражена, на відміну від тварин групи КП. Просвіти венул рівномірно розширені, помірно повнокровні. Ендотеліальна вистелка венул суцільна. Адгезія та діapedез лейкоцитів крізь стінки венул значно менш виражені, ніж у групі тварин КП.

Просвіти кровоносних капілярів нерівномірні, їхня ендотеліальна вистелка цілісна. Базальна мембрана у стінках капілярів однорідної товщини та забарвлення. Діapedезні крововиливи відсутні. Інтерстицій навколо капілярів не розпушений, із поодинокими лімфоцитами.

Отже, профілактичне введення ЕРР щурам в умовах ХІС зменшує дистрофічні та деструктивні зміни в міокарді — як у кардіоміоцитах, так і в судинах мікроциркуляторного русла. У більшій частині кардіоміоцитів щурів, які отримували ЕРР, подібно до групи інтактних тварин, наявна поперечна посмугованість, а саркоплазма помірно базofilна. У судинах кровоносного мікроциркуляторного русла патологічні зміни також менш виражені. Ендотеліальна вистелка артеріол і венул суцільна. Тромби в артеріолах і венулах відсутні, на відміну від тварин групи КП.

Рисунок 4



**Фрагмент міокарда щурів, які отримували ЕРР на тлі гіпокінезії (15-а доба)**

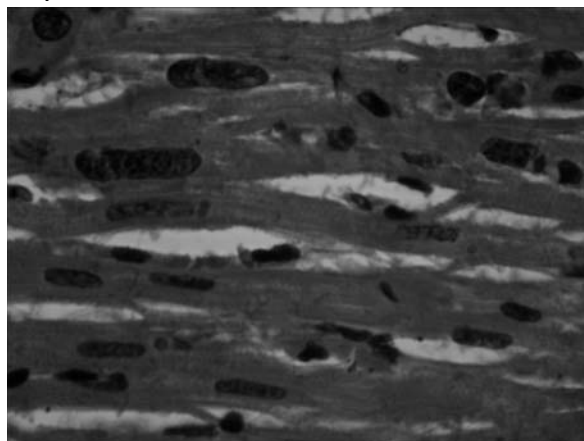
Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ . Некроз кардіоміоцита.

Венули помірно повнокровні, просвіти кровоносних капілярів незначно розширені, помірно повнокровні. У периваскулярних просторах ознаки набряку відсутні. Ендотеліоцити у стінці кровоносних капілярів за будовою подібні до таких групи інтактних тварин. Значно зменшені прояви адгезії та діapedезу лейкоцитів крізь стінки судин кровоносного мікроциркуляторного русла, відсутні діapedезні крововиливи. Це може свідчити про кардіопротекторну дію ЕРР в умовах ХІС.

При застосуванні ЕКО на тлі ХІС суттєві деструктивні зміни в міокарді відсутні; на відміну від тварин групи КП його структура збережена. Однак наявна анізоморфія кардіоміоцитів: деякі клітини неоднорідні за розмірами. Більшість кардіоміоцитів за формою та розмірами подібні до таких в інтактних тварин, проте виявляються волокна з гіпотрофічними кардіоміоцитами, ядра яких видовженої форми, темні, а в саркоплазмі відсутня поперечна посмугованість. Контури окремих клітин звивисті, вони перескорочені, проте такі вогнища поодинокі і містять (2-3) кардіоміоцита. Наявні волокна з гіпертрофованими кардіоміоцитами. Ядра в таких клітинах збільшені в розмірах, мають добре виражені ядерця, що вказує на гіперфункцію. Саркоплазма гіпертрофованих кардіоміоцитів добре структурована. Як і у інтактних щурів, у ній чітко виявляється поперечна посмугованість (Рис. 5).

Просвіти артеріол помірно повнокровні, ендотеліальна вистелка в їх стінках цілісна. У середній оболонці стінок артеріол відмічається

Рисунок 5



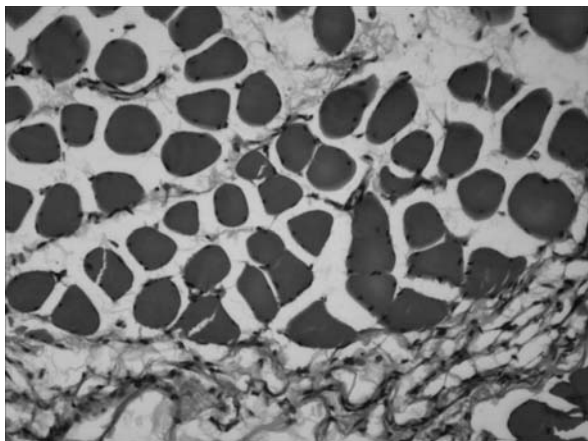
**Фрагмент міокарда щурів, які отримували ЕКО на тлі гіпокінезії (15-а доба)**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10$ . Волокна з гіпертрофованими кардіоміоцитами, ядра останніх збільшені та нормальних розмірів; саркоплазма з поперечною посмугованістю; розширені просвіти капілярів.

незначна гіпертрофія гладких міоцитів, однак тромби у просвітах артеріол відсутні, на відміну від щурів групи КП. Просвіти венул незначно розширені, проте, на відміну від тварин групи КП, значно зменшена адгезія та діapedез лейкоцитів. Інтерстиціальна тканина навколо артеріол і венул не розпушена, без ознак набряку. Просвіти кровоносних капілярів неоднорідні, виявляються ділянки розширених (Рис. 5) і звужених капілярів. Проте ендотеліоцити у стінці кровоносних капілярів подібні за будовою до таких в інтактних тварин. Базальна мембрана у кровоносних капілярах не розпушена, діapedезні крововиливи відсутні.

Таким чином, ЕКО в умовах гіпокінезії виявляє ендотеліопротекторну дію, а також норма-

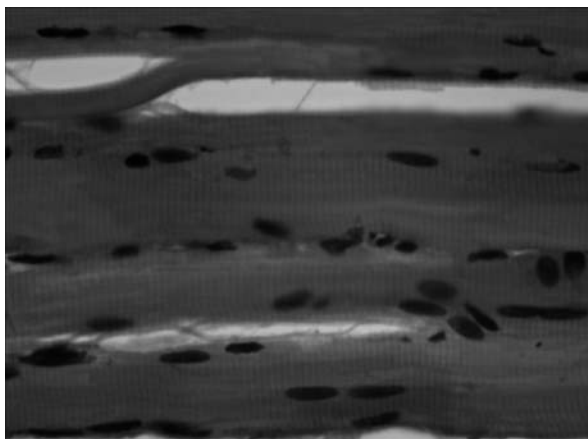
Рисунок 6



**Фрагмент чотириголового м'яза інтактного щура**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 10$ ; окуляр  $\times 10$ . М'язові волокна, ендомізій та перимізій нормальної будови.

Рисунок 7



**Фрагмент чотириголового м'яза інтактного щура**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ . М'язові волокна з чіткою поперечною посмугованістю, сферичні міосателіоцити, міосимпласти.

лізує гемодинаміку, зменшуючи стаз, адгезію та діapedез лейкоцитів крізь стінку судин, редукує набряк інтерстицію. ЕКО виявляє кардіопротекторну дію, що підтверджується відсутністю значних деструктивних змін у кардіоміоцитах. Збільшення чисельності гіпертрофованих кардіоміоцитів при дії ЕКО на тлі гіпокінезії потребує подальшого вивчення.

**Скелетні м'язи.** У інтактних щурів гісто-структура чотириголового м'яза стегна має типову організацію та подібна до описаної у літературі. М'яз складається із пучків першого порядку м'язових волокон, покритих ендомізійом, що утворюють пучки другого порядку, покриті перимізійом (Рис. 6). Назовні м'яз покритий епімізієм. У стромі розташовані нервові волокна, кровоносні та лімфатичні судини. У клітинному складі стромальної пухкої сполучної тканини переважають фібробласти, однак виявляються поодинокі гістіоцити, лімфоцити, колагенові й еластичні волокна.

М'язові волокна складаються із міосимплас-тів і міосателіоцитів. Міосимпласти циліндрич-ної форми мають довжину м'яза, їх ядра видо-вженої форми, нормохромні, розташовані на периферії саркоплазми. На повздовжніх зрізах у саркоплазмі визначається чітко структурова-на поперечна посмугованість. Міосателіоцити мають сферичну форму, слабобазофільну ци-топлазму, їхні ядра сферичні та за розмірами переважають ядра, розташовані у саркоплазмі міосимплас-тів (Рис. 7).

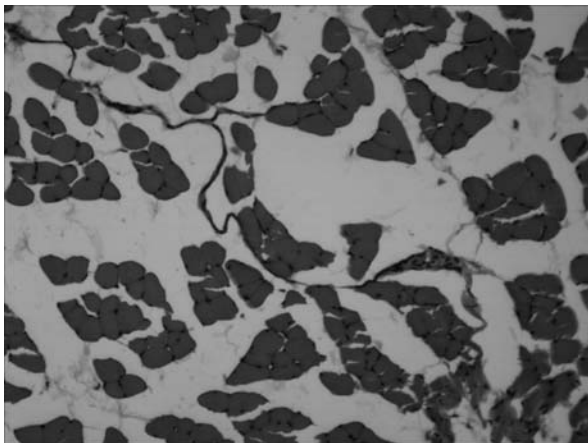
Гісто-структура чотириголового м'яза щурів групи КП подібна до такої в інтактних тварин. Однак будова м'язових волокон неоднорідна. У саркоплазмі деяких волокон відсутня попере-чна посмугованість. Спостерігається анізомор-фія м'язових волокон. Виявляються витончені волокна з гіперхромними ядрами та гіпертро-фовані волокна, чисельність їх значно менша, ніж атрофованих. У саркоплазмі наявні ядра у вигляді ланцюжків на периферії волокон. В атрофічних м'язових волокнах чисельність ядер зменшена. Наявні пікнотичні ядра. Навколо та-ких ділянок скупчені макрофаги. Мають місце ділянки м'язових волокон із гомогенізованою саркоплазмою та волокна із чисельними ваку-олями у саркоплазмі. Окремі волокна звивисті, перескорочені, деякі розволокнені, вогнищево лізовані, із гістіолімфоцитарною інфільтрацією (Рис. 8-10). Сполучнотканинні прошарки між м'язовими волокнами розширені, містять фі-бробласти, гістіоцити, колагенові й еластичні волокна.

Судини мікроциркуляторного русла м'яза нерівномірно кровонаповнені. Значну частину



просвітів артеріол займають пристінкові тромби (Рис. 9). Ендотеліальна вистелка у стінках артеріол не суцільна, наявні ділянки десквамації та регенерації ендотеліоцитів. У субендотеліальному шарі стінки артеріол виражений набряк. У середній оболонці стінки артеріол виявляється гіпертрофія та гіперплазія міоцитів. Просвіти венул розширені, повнокровні, подекуди в них наявні агрегати еритроцитів і тромбоцитів. Ендотеліоцити у стінках венул анізоморфні: поряд із клітинами, що за структурою подібні до таких у інтактних щурів, спостерігаються ділянки нагубання ендотеліоцитів. Ядра таких ендотеліоцитів гіперхромні. Адгезія та діapedез лейкоцитів крізь стінки венул виразніші, ніж у інтактних щурів.

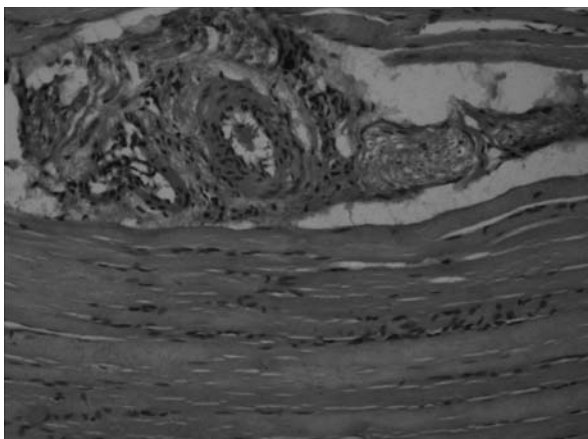
Рисунок 8



**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 10$ ; окуляр  $\times 10$ . Значний набряк сполучної тканини в перимізії.

Рисунок 9



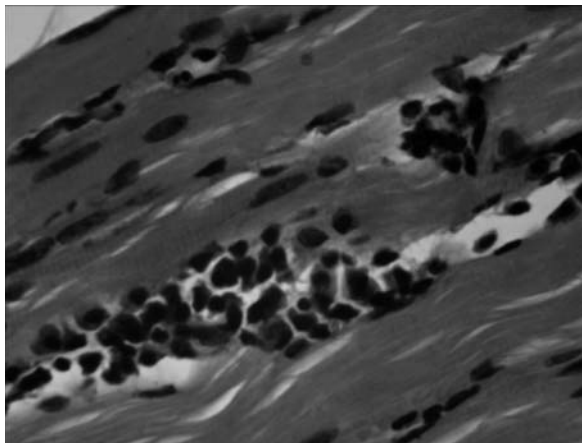
**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 10$ ; окуляр  $\times 10$ . Тромби у просвітах артеріол, гістіолімфоцитарна інфільтрація м'язових волокон.

Просвіти капілярів неоднорідні: поряд зі звуженими, позбавленими формених елементів, виявляються розширені повнокровні капіляри. Ендотеліальна вистелка у капілярах не суцільна, базальна мембрана розпушена. Навколо капілярів є поодинокі діapedезні крововиливи. Периваскулярна сполучна тканина розпушена, у багатьох полях зору виявляються периваскулярні інфільтрати із лімфоцитів та гістіоцитів.

Таким чином, при гіпокінезії у скелетній м'язовій тканині виявляються атрофічні та деструктивні зміни м'язових волокон, гіпертрофія та гіперплазія фібробластів і колагенових волокон в ендомізії та перимізії. Зміни у судинах характеризуються повнокрів'ям, стазом і агрегацією формених елементів крові у просвітах, а

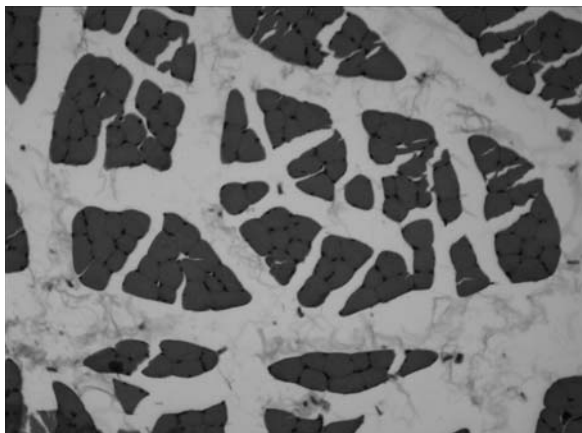
Рисунок 10



**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ . Розволоknені м'язові волокна з вогнищами лізису, лейкоцитарна інфільтрація ендомізії.

Рисунок 11



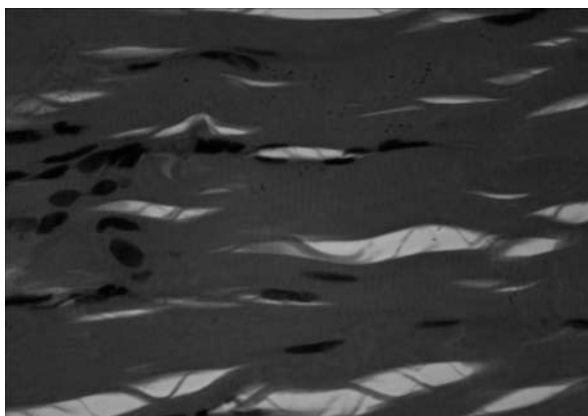
**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії на тлі введення ЕРР**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 10$ ; окуляр  $\times 10$ . Незначний набряк сполучної тканини в перимізії.

також підвищеною проникністю стінок судин для плазми та формених елементів крові.

М'язові волокна у щурів, яким на тлі гіпокінезії вводили ЕРР, подібні до таких у інтактних тварин. Збережена поперечна посмугованість, ядра видовженої форми, нормохромні, із добре вираженими ядрецями. Наявні поодинокі гіпотрофічні м'язові волокна з темними ядрами, вакуолізованою саркоплазмою та слабо вираженою поперечною посмугованістю. Поряд розташовані гіпертрофічні волокна з добре вираженою поперечною посмугованістю та великими сферичної форми ядрами із просвітленим хроматином і добре вираженими ядрецями (Рис. 11, 12).

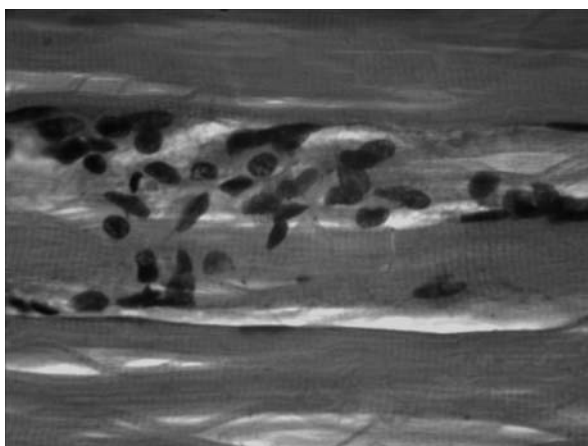
Рисунок 12



**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії на тлі введення ЕРР**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ . Гіпертрофовані та гіпотрофовані м'язові волокна.

Рисунок 13



**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу ХІС на тлі введення ЕРР**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ . Проліферація міосателітоцитів, вакуольна дистрофія міосимпластів.

Міосателітоцити гіпертрофовані, їх цитоплазма слабо базофільна, спостерігаються вогнища проліферації цих клітин. Виявляється вакуольна дистрофія міосимпластів (Рис. 13). В ендомізії наявна незначна гістіолімфоцитарна інфільтрація, гіпертрофія та гіперплазія фібробластів і колагенових волокон. Перимізій дещо розширений, спостерігається гіпертрофія та гіперплазія фібробластів і колагенових волокон.

Просвіти кровоносних судин виповнені форменими елементами та плазмою. В артеріолах, на відміну від групи тварин КП, ендотеліальна вистелка цілісна, відсутній набряк субендотеліального шару. У середній оболонці артеріол виявляється незначна гіпертрофія гладких міоцитів.

Просвіти венул помірно повнокровні, незначно розширені. Ендотеліоцити у стінках венул утворюють суцільний шар, за будовою подібні до таких у інтактних щурів. Адгезія та діapedез лейкоцитів значно менш виражені, ніж у тварин групи КП. Просвіти капілярів неоднорідні, наявні звужені й розширені ділянки, проте, на відміну тварин групи КП, ендотеліальна вистелка цілісна, а базальна мембрана однорідна, не розпушена. Діapedезні крововиливи навколо капілярів відсутні. У периваскулярних просторах розташовані поодинокі лімфоцити та макрофаги. Таким чином, при застосуванні ЕРР на тлі ХІС деструктивні зміни у скелетних м'язових волокнах та ендотеліоцитах стінки судин менш виражені, ніж у тварин групи КП.

ЕКО в умовах ХІС зменшує патологічні зміни у м'язах порівняно із КП. М'язові волокна не однорідні, за структурою подібні до таких в інтактних тварин. Трапляються гіпертрофічні та гіпотрофічні волокна, проте останніх значно менше, ніж у тварин групи КП (Рис. 14).

Поперечна посмугованість у саркоплазмі більшої частини м'язових волокон добре виражена. Подекуди виявляються ділянки вакуолізованої саркоплазми. Окремі гіпотрофічні волокна звивисті, більша частина їх подібна за будовою до таких в інтактних тварин.

Спостерігається зростання чисельності гіпертрофованих волокон, гіпертрофії та гіперплазії міосателітоцитів (Рис. 15). Ядра в більшій частині м'язових волокон розташовані на периферії. Вони мають видовжену форму, нормохромні, містять добре виражені ядреця. Відмічається гіпертрофія та гіперплазія міосателіоцитів сферичної форми зі слабо базофільною цитоплазмою, їх ядра гіпертрофовані, сферичні. В ендомізії та перимізії виражена гіпертрофія та гіперплазія фібробластів і колагенових волокон. Прошарки ендомізії незначно розшире-

ні. У клітинному складі сполучної тканини, як і в інтактних щурів, переважають фібробласти, проте виявляються лімфоцити та поодинокі гістіоцити.

Просвіти артеріол подібні до таких у інтактних тварин. Стінки артеріол у перимізії незначно потовщені за рахунок гіпертрофії та гіперплазії гладких міоцитів у середній оболонці. Ендотеліальна вистелка цілісна. Ендотеліоцити в стінці артеріол і венул за будовою подібні до таких у інтактних тварин. Просвіти венул помірно повнокровні, незначно розширені. Адгезія та діapedез формених елементів крові крізь стінки венул виражена менше, ніж у щурів групи КП. Просвіти капілярів незначно

розширені, на відміну від щурів групи КП, ендотеліоцити утворюють суцільний шар, базальна мембрана однорідна, не розпушена, а діapedезні крововиливи відсутні. У периваскулярних просторах розташовані поодинокі лімфоцити, як і в інтактних щурів.

Таким чином, ЕКО на тлі гіпокінезії, подібно до ЕРР, зменшує деструктивні зміни у м'язових волокнах, сприяє проліферації міосателітоцитів і гіпертрофії м'язових волокон, зменшує деструктивні зміни у стінках судин мікроциркуляторного русла.

Викладені результати морфологічних досліджень добре узгоджуються з показниками фізичної витривалості тварин, які отримували ЕРР та ЕКО. У тесті 20-кратного повторного плавання мишей без перерви ЕКО скорочував час розвитку втоми на рівні ЕРР [5]. У тварин, яких піддавали іммобілізаційному стресу, у плавальному тесті з навантаженням час плавання до виснаження знижувався на 27 % ( $p < 0.05$ ) порівняно з інтактним контролем, а на тлі ЕКО та ЕРР він не мав вірогідних відмінностей із контрольним показником [6]. Зростанню фізичної витривалості, у тому числі на ускладненій моделі за умов попередньої іммобілізації, очевидно, сприяє доведене у даному дослідженні покращення морфологічного стану міокарда, що нормалізує гемодинаміку, а також гістоструктуру скелетних м'язів та їх мікроциркуляторного русла, що забезпечує збільшення витривалості на рівні ефektorних органів.

Результати доводять перспективність створення вітчизняного адаптогенного та стреспротекторного засобу на основі ЕКО, що, виходячи із наведених експериментальних досліджень, не поступається класичному фітоадаптогену ЕРР.

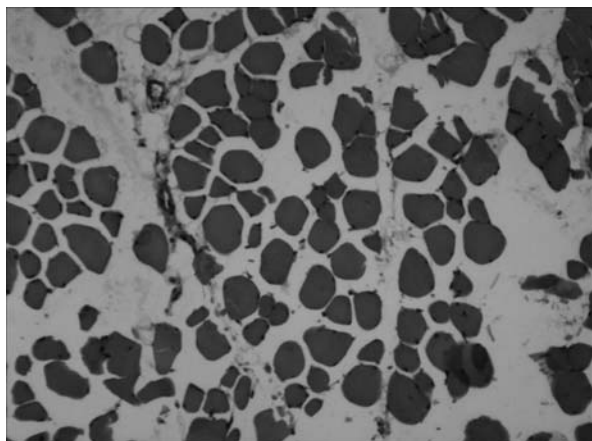
**Висновки**

На тлі хронічного іммобілізаційного стресу у щурів відбуваються значні деструктивні зміни у міокарді та скелетних м'язах.

Екстракт кори осики, що являє собою поліфенольний комплекс, у дозах, вищих за протизапальні, при хронічному іммобілізаційному стресі виявляє кардіопротекторну дію, попереджаючи розвиток дистрофії та вогнищ некрозу серцевого м'яза, зменшуючи порушення структури кровоносного мікроциркуляторного русла, забезпечуючи ендотеліопротекторний ефект, а також зменшує деструктивні зміни у скелетних м'язових волокнах, сприяє проліферації міосателітоцитів і гіпертрофії м'язових волокон.

За вираженістю захисного впливу на серце та скелетні м'язи екстракт кори осики не посту-

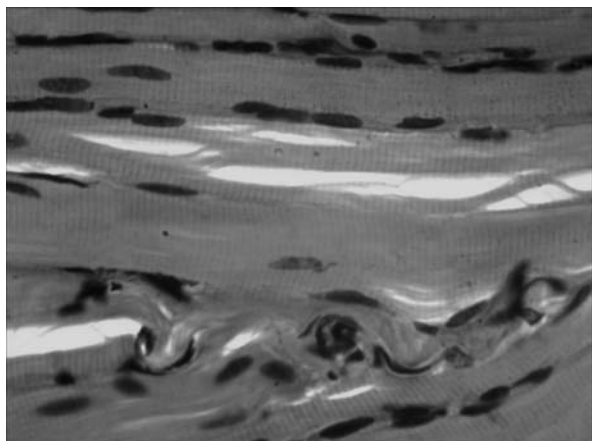
Рисунок 14



**Фрагмент чотириголового м'яза щура на 15-у добу гіпокінезії та тлі застосування ЕКО**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 10$ ; окуляр  $\times 10$ . Наявні гіпер- та поодинокі гіпотрофічні м'язові волокна.

Рисунок 15



**Фрагмент поперечно-посмугової м'язової тканини щура на 15-у добу гіпокінезії на тлі застосування ЕКО**

Гематоксилін-еозин. Об'єктив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ . Гіпертрофоване м'язове волокно.

пається класичному фітоадаптогену — екстракту родиоли рідкому.

Результати є експериментальним обґрунтуванням доцільності розробки нового вітчизняного адаптогенного засобу із доступної рослинної сировини — кори осики.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бородіна Н.В. Фармакогностичне дослідження рослин роду тополя: Автореф. дис. ... к.фарм.н. — Київ, 2007. — 21 с.
2. Киричек Л.Т. Экспериментальное обоснование применения нейротропных средств при иммобилизации: Автореф. дисс. ... д.мед.н. — К., 1989. — 37 с.
3. Ковальчук І.В. Особливості комплексного застосування фітосбору родиоли рожевої і діазепаму в умовах експериментальної стресової імуносупресії / І.В. Ковальчук, Я.В. Рожковський // Клінічна фармація. — 2010. — Т. 14, № 13. — С. 60-65.
4. Куркин В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений, распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность / В.А. Куркин // Химия природных соединений. — 2003. — № 2. — С. 87.
5. Луцак І.В. Вивчення адаптогенних властивостей екстракту кори осики / І.В. Луцак., С.Ю. Штриголь // Клінічна фармація. — 2011. — Т. 15, № 3. — С. 62-66.
6. Луцак І.В. Вплив фітоадаптогенів на поведінкові реакції та фізичну витривалість після іммобілізаційного стресу / І.В. Луцак, С.Ю. Штриголь // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання створення нових лікарських засобів — Х»: НФаУ, 2012. — С.387.
7. Пат. 73209 Україна, МПК7, А61К35/78. Спосіб одержання біологічно активних комплексів кори осики, які виявляють антимікробну, репаративну, протизапальну, анальгетичну та діуретичну активність: Пат. 73209 Україна, МПК7, А61К35/78 Н.В. Бородіна, В.М. Ковальов, І.Л. Дикий та ін. — Опубл. 15.06.2005. — Бюл. № 6.
8. Саратиков А.С. Родиола розовая — ценное лекарственное растение (золотой корень). — 3-е изд., испр. и доп. / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов. — Томск: Изд-во Томского университета, 1987. — 254 с.
9. Panossian A. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy / A. Panossian, G. Wikman, J. Sarris // *Phytomedicine*. — 2010. — Vol. 6, № 17. — P. 481-493.

#### Резюме

Луцак І.В., Штриголь С.Ю., Король А.П.

#### Морфологическая характеристика адаптогенного эффекта экстракта родиолы жидкого и экстракта коры осины на модели иммобилизационного стресса

В исследованиях на крысах на модели хронического иммобилизационного стресса (15 суток по 16 ч ежедневно) экстракт коры осины (1 г/кг в желудок в течение периода

иммобилизации) оказывает кардиопротекторный эффект, предупреждая развитие дистрофии и очагов некроза сердечной мышцы, уменьшая нарушения микроциркуляторного русла, обеспечивая эндотелиопротекторный эффект, а также уменьшает деструктивные изменения в скелетных мышечных волокнах, способствует пролиферации миосателлитов и гипертрофии мышечных волокон. По выраженности защитного влияния на сердце и скелетные мышцы экстракт коры осины не уступает классическому фитоадаптогену — экстракту родиолы жидкому (1 мл/кг при аналогичном режиме введения).

**Ключевые слова:** иммобилизационный стресс, гистоструктура миокарда и скелетных мышц, экстракт коры осины, экстракт родиолы жидкой.

#### Summary

Lutsak I.V., Shtrygol S.Yu., Korol A.P.

#### Morphological characteristic of adaptogenic effect of rhodiola liquid extract and aspen bark extract on a model of immobilization stress

At rats on a model of chronic immobilization stress (15 days, 16 hours daily) aspen bark extract (1 mg / kg in the stomach during the period of immobilization) revealed cardio protective effect, prevented the development of dystrophy and focus of necrosis of the cardiac muscle, reduced dysfunction of microcirculation vessels, provided endothelial protective effect and reduced destructive changes in skeletal muscle fibers, promoted proliferation of miosatellitocytes and hypertrophy of muscle fibers. According to the expressiveness of the protective effect on the heart and skeletal muscles aspen bark extract did not yield to classical phyto-adaptogen (rhodiola liquid extract (1 ml/kg with a similar mode of administration)).

**Key words:** immobilization stress, histostructure of myocard and skeletal muscles, aspen bark extract, rhodiola liquid extract.

**Луцак Ірина Василівна.** Аспірант кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, викладач фармакології Житомирського базового фармацевтичного коледжу ім. Г.С. Протасевича (2007).

**Штриголь Сергій Юрійович.** Д.мед.н. (2000). Професор (2000). Зав. кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (2011).

**Король Анатолій Петрович.** К.мед.н. (1986). Доцент (2002). Доцент кафедри гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Шульга Л.І.

Національний фармацевтичний університет

## Антиоксидантний профіль нового рослинного засобу – дослідження на модельних системах *in vitro*

Представлено результати з вивчення антиоксидантної (антисупероксидної, антирадикальної, хелатуючої) активності складної настойки методами *in vitro*. Висунуто припущення щодо механізму антиоксидантної дії, що реалізується за рахунок участі біологічно активних речовин, серед яких фенольні сполуки, у зв'язуванні іонів  $Fe^{2+}$ , інгібуванні утворення гідроксил-радикалу  $OH\cdot$  і супероксидного аніон-радикалу  $O_2^{\cdot-}$

*Ключові слова:* дослідження *in vitro*, антиоксидантна активність, фенольні сполуки, складна настойка

Протягом останніх десятиріч увагу клініцистів зосереджено на вдосконаленні тактики надання медикаментозної терапії при стоматологічних захворюваннях, зокрема запальних хворобах пародонту та слизової оболонки порожнини рота. При використанні існуючих лікувально-профілактичних засобів не відмічається тенденції до зменшення їх кількості, що свідчить про необхідність і своєчасність активізації нових розробок [5-7].

У патогенезі захворювань пародонту запального характеру важливе значення, за даними вітчизняних та закордонних вчених, відводиться процесам перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що обґрунтовує патогенетичну доцільність включення до комплексу лікувальних заходів запальних захворювань ротової порожнини потужних антиоксидантів природного та синтетичного походження для посилення антиоксидантного захисту й уповільнення вільнорадикальної активності [4, 15, 24].

На кафедрі загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ під керівництвом д. фарм. н., проф. Пімінова О.Х. розроблено склад і технологію одержання складної настойки під умовною назвою «Касдент» [9]. Проведеним біологічним вивченням доведено мембранопротекторний ефект, встановлено наявність вираженої антимікробної й антифунгальної активностей розробленого лікарського фітозасобу по відношенню до музейних і клінічних штамів грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* [3, 21]. Фітохімічними дослідженнями одержано уявлення щодо спектру біологічно активних сполук рідкої лікарської форми, а саме: встановлено присутність летких речовин, вільних і зв'язаних амінокислот, фенольних сполук, жирних кислот [10-12, 21].

На цей час накопичено вагомий експериментальний матеріал, що свідчить про взаємозв'язок антиоксидантної активності (АОА) фенольних сполук з їх структурою, а також здатність флавоноїдів зв'язувати іони важких металів — каталі-

заторів окисних процесів з утворенням стійких комплексів або взаємодіяти з високоактивними вільними радикалами, виступати донорами атома водню, зупиняючи ланцюг окисних реакцій, виявляти антирадикальну активність [1, 2, 8, 14, 16, 18-20, 23].

Встановлення перелічених властивостей доповнило би фармакотерапевтичну цінність рослинного стоматологічного засобу, оскільки нормалізація антиоксидантного захисту організму за допомогою препаратів з антиоксидантним потенціалом — перспективний напрямок комплексної терапії хворих із запальними станами пародонту.

Метою даної роботи є дослідження на модельних системах *in vitro* антисупероксидної, антирадикальної та хелатуючої дії для зв'язування антиоксидантного профілю та припущення механізму АОА настойки «Касдент».

### *Матеріали та методи*

Об'єкт дослідження — фітозасіб під умовною назвою «Касдент». Як препарат порівняння обрано рідкий рослинний лікарський засіб «Стоматофіт» («Фітофарм Кленка С.А.», Польща), що широко застосовується клініцистами у стоматології.

Дослідження із визначення антиоксидантних властивостей методами *in vitro* [17, 22] проводили в лабораторії біохімії ДУ «Інститут стоматології АМН України» (м. Одеса) під керівництвом д.б.н. Макаренко О.А.

Вміст фенольних сполук (мг/мл), у перерахунку на рутин, у досліджуваній настойці та препараті «Стоматофіт» визначали на спектрофотометрі UV mini-1240 («Shimadzu», Японія) у кварцових кюветах з товщиною шару 1 см за довжини хвилі  $\lambda = 750$  нм, використовуючи реактив Фоліна. Вміст суми флавоноїдів (мг/мл), у перерахунку на рутин, встановлювали спектрофотометричним методом ( $\lambda = 410.5$  нм) за реакцією утворення комплексу флавоноїдів зі спиртовим розчином алюмінію хлориду.

Антисупероксидну активність (АСА) (од/мл) досліджуваних об'єктів визначали спектрофотометричним методом ( $\lambda = 560$  нм) за здатністю фенольних сполук конкурувати з тетразолієвим синім у реакції відновлення супероксидних радикалів ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Антирадикальну активність (АРА) (од/мл) (гальмування утворення ОН) оцінювали спектрофотометрично за довжини хвилі 520 нм за здатністю об'єктів дослідження віддавати рухомий атом водню або електрон вільному радикалу дифенілпікрілгідразу, що супроводжується зниженням оптичної густини.

Хелатуючу активність (ХА) (од/мл) визначали спектрофотометричним методом ( $\lambda = 560$  нм) із ферозинном (DAS-SpectroMed S.R.L., Молдова), враховуючи властивість рослинних засобів зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ .

Для кожного з об'єктів проводили розрахунки одержаних даних АСА, АРА, ХА відносно вмісту флавоноїдів та фенольних сполук: АСА/флавоноїди, АСА/фенольні сполуки, АРА/флавоноїди, АРА/фенольні сполуки та ХА/флавоноїди, ХА/фенольні сполуки та порівнювали визначені показники.

Статистичну обробку одержаних значень проводили відповідно до вимог ДФУ [25].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Результати визначення вмісту флавоноїдів і загального вмісту фенольних сполук у складній настійці та препараті «Стоматофіт» представлено у Таблиці. Аналізуючи одержані результати слід відзначити, що вміст флавоноїдів і фенольних сполук у настійці порівняно зі Стоматофітом дещо бідніший: концентрація флавоноїдів в 1.45 рази, а загальний вміст фенольних сполук в 1.7 рази нижчий.

Здатність біологічно активних речовин рослинних засобів пригнічувати продукцію

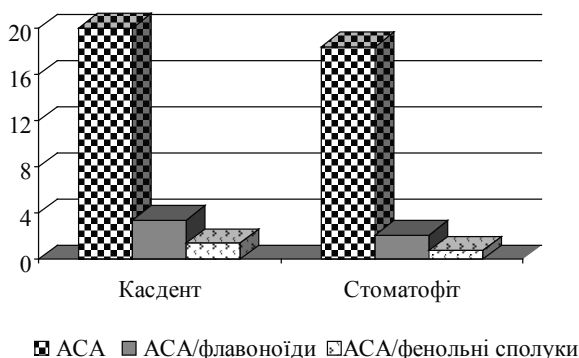
супероксиданіон-радикалів та гідроксил-радикалів відображено на Рис. 1 та Рис. 2.

Дослідженнями антиоксидантних властивостей *in vitro* (Рис. 1 і Рис. 2) виявлено, що біологічно активні сполуки, переважно флавоноїди та фенольні сполуки настійки «Касдент», пригнічують продукцію супероксиданіон-радикалів на рівні, а гідроксил-радикалів більше, ніж відповідні діючі речовини препарату «Стоматофіт».

Встановлено, що параметри АСА/флавоноїди та АРА/флавоноїди вище для настійки. Отже, флавоноїди настійки більш активні у порівнянні із флавоноїдами Стоматофіту щодо АСА в 1.6 рази, АРА – в 1.77 рази. Фенольні речовини настійки також виявилися більш активними антиоксидантами, ніж відповідні сполуки Стоматофіту. Так, АСА фенольних сполук настійки в 1.87 раз вище АСА фенольних сполук Стоматофіту, а значення відношення АРА/фенольні сполуки розробленого засобу до відповідного параметру Стоматофіту дорівнює 2.1.

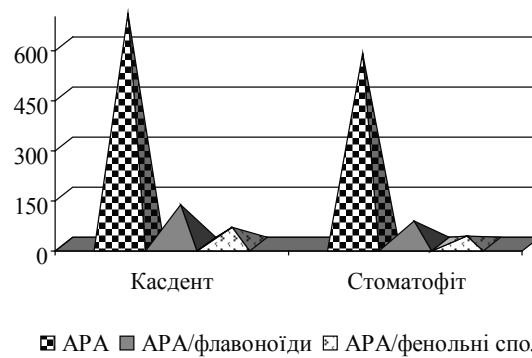
Супероксид-радикал – радикал, що виявляє високу активність і може реагувати із ДНК, білками, мембранами, пошкоджуючи їх. Даний радикал, оточений молекулами води, – основа для утворення інших активних форм кисню (гідроксил-радикалу, азоту діоксиду, водню пероксиду), оскільки, опинившись усередині клітини, він не може подолати мембрану. Гідроксил-радикал, одержаний відновленням із водню пероксиду, виявляє потужну реакційну здатність, спроможність окиснювати будь-яку речовину клітини [4, 13]. У зв'язку з цим, можливість інактивувати гідроксильні радикали – один із важливих показників активності антиоксиданта. Таким чином, виявлення антисупероксидних і антирадикальних властивостей розробленої настійки «Касдент» – вагома позитивна характеристика її антиоксидантного профілю.

Рисунок 1



Антисупероксидна активність досліджуваних препаратів

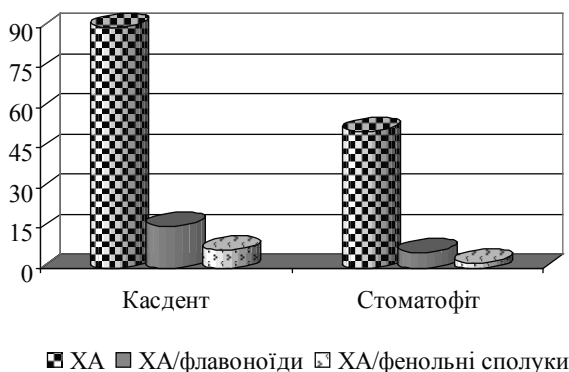
Рисунок 2



Антирадикальна активність досліджуваних препаратів

На Рис. 3 наведено результати вивчення хелатуючих властивостей досліджуваних лікарських засобів. Показано, що біологічно активні речовини Касденту та Стоматофіту на модельних системах *in vitro* виявляли здатність зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ , а саме - у присутності іонів металів відбувається ініціювання процесів ПОЛ.

Рисунок 3



**Хелатуючі властивості досліджуваних препаратів**

Таким чином, антиоксиданти, яким притаманні хелатуючі властивості, здатні обривати ланцюг каскадних реакцій і запобігати функціональним і структурним порушенням, викликаним продуктами ПОЛ.

За даними, наведеними на Рис. 3, відзначали найбільш виражені відмінності значень досліджуваних параметрів. Значення ХА фітозасобу «Касдент» майже у 2 рази вище за значення ХА препарату порівняння. Параметр ХА/флавоноїди вище для розробленої настойки (у 2.65 рази). Хелатуюча здатність фенольних сполук настойки (ХА/фенольні сполуки) більше ніж у 3 рази вища, ніж фенольних сполук Стоматофіту.

Одержані результати дозволили доповнити уявлення щодо складу біологічно активних речовин настойки, зокрема флавоноїдів та інших фенольних сполук, та її антиоксидантних властивостей.

Виходячи із отриманих даних, флавоноїди та фенольні сполуки фітозасобу під умовною назвою «Касдент» можна віднести до потужних антиоксидантних агентів, що виявляють

значну антисупероксидну, антирадикальну та хелатуючу реакційну здатність. Вищенаведене підкреслює виправданість очікування ефективності при застосуванні настойки у терапевтичній стоматології для усунення ряду патологій, що супроводжуються спалахом вільнорадикальних процесів.

**Висновки**

На модельних системах *in vitro* досліджено антиоксидантні властивості (антисупероксидну, антирадикальну та хелатуючу дії) складної настойки під умовною назвою «Касдент» та лікарського засобу «Стоматофіт».

Встановлено антиоксидантний профіль розробленого фітозасобу – наявність антиоксидантної дії на стадії утворення активних форм кисню, таких як пошкоджуючий супероксидрадикал, здатність гальмувати сильний окисник – гідроксильний радикал та зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ .

Одержані результати є підставою вважати рослинний засіб «Касдент» потенційним антиоксидантним агентом, що зможе пригнічувати або інактивувати процеси вільнорадикального окиснення, тим самим перешкоджаючи подальшому перебігу запальних процесів у ротовій порожнині.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Антиоксидантні свойства некоторых природных биофлавоноидов / О.А. Макаренко, А.П. Левицкий, В.И. Литвиненко, И.В. Ходаков // Вісник ОНУ. – 2010. – Т. 15, № 6. – С. 15-21.
2. Боригов О.Ю. Антиоксидантна активність представників різних класів флавоноїдів *in vitro* / О.Ю. Боригов // Вісник фармації. – 2010. – № 3. – С. 73-75.
3. Вивчення мембраностабілізуючої активності рослинного лікарського засобу / Л.І. Шульга, О.А. Щербак, Л.М. Малоштан, О.Ф. Пімінов // Фармацевтичний часопис. – 2011. – № 3. – С. 99-101.
4. Демкович А.Є. Активні форми кисню в механізмах розвитку і перебігу запальних процесів одонтогенного походження / А.Є. Демкович // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012. – № 1. – С. 51-54.
5. Експериментальні дослідження впливу Фламікару та кораргіну, які іммобілізовані на силіксі, на ліпопероксидацію в пародонті щурів / Ю.І. Губський, А.В. Юрженко, Т.С. Брюзгіна, В.М. Барвінченко // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 98-101.

Таблиця

**Вміст флавоноїдів, фенольних сполук та антиоксидантна активність досліджуваних лікарських засобів**

Об'єкт дослідження	Вміст (мг/мл)		Антиоксидантна активність (од/мл)		
	флавоноїди	фенольні сполуки	АСА	АРА	ХА
Касдент	5.9±0.3	13.9±1.1	20.3±1.4	691.8±63.2	93.2±3.5
Стоматофіт	8.6±0.5	23.6±1.8	18.4±0.9	570.4±45.8	51.3±5.2

Примітка.  
n=6.

6. Зубачик В.М. Вплив зубних еліксирів з вмістом екстракту цитрусових на стан антиоксидантної та прооксидантної систем ясен і сироватки крові щурів при перекисному пародонтиті / В.М. Зубачик, І.П. Дзуліт, А.П. Левицький // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. — 2008. — № 4. — С. 40-44.
7. Левицький А.П. Порівняльна гіпоглікемічна і антиоксидантна ефективність препаратів з поліфенолами при експериментальному діабеті II типу / А.П. Левицький, Ю.В. Цісельський // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. — 2009. — № 2. — С. 7-10.
8. Луценко Ю.О. Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у листі пляща звичайного / Ю.О. Луценко, І. Маглавська, Р.Є. Дармограй // *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. — 2010. — № 1-2. — С. 85-87.
9. Пат. 66282 Україна, МПК А61К 6/00. Фармацевтична композиція «Касдент» з антимікробною та антифунгальною дією: Пат. 66282 Україна, МПК А61К 6/00 Л.І. Шульга, О.Ф. Пімінов, Т.П. Осолодченко. — № 201107930; Заявл. 23.06.2011; Опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
10. Фенольные соединения новой растительной композиции и ее антиоксидантный потенциал / Л.И. Шульга, А.П. Левицкий, А.Ф. Пиминов, О.А. Макаренко // *Вісник стоматології*. — 2012. — № 7. — С. 43-44.
11. Шульга Л.І. Дослідження амінокислотного складу настійки комплексної дії / Л.І. Шульга // *Фітотерапія*. Ча-сопис. — 2012. — № 1. — С. 70-73.
12. Шульга Л.І. Хромато-мас-спектрометричний аналіз компонентного складу легкої фракції настійки «Касдент» / Л.І. Шульга, В.С. Кисличенко, О.Ф. Пімінов // *Український медичний альманах*. — 2011. — Т. 4, № 4. — С. 186-189.
13. Burda S. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids / S. Burda, W. Oleszek // *J. Agric. Food Chem.* — 2001. — Vol. 49, № 6. — P. 2774-2779.
14. Croft K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids / K.D. Croft // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1998. — Vol. 854. — P. 435-442.
15. Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants / W.C. Hou, R.D. Lin, K.T. Cheng et al. // *Phytomedicine*. — 2003. — Vol. 10. — P. 170-175.
16. Importance of flavonoids in therapeutics / T. Shohaib, M. Shafique, N. Dhanya et al. // *H. J. D. Med.* — 2011. — Vol. 3, № 1. — P. 1-18.
17. Nadaroglu H. Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris Germanica* / H. Nadaroglu, Y. Demir, N. Demir // *Хим.-фарм. журнал*. — 2007. — Т. 41, № 8. — С. 13-18.
18. Noguchi C. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis / C. Noguchi, E. Nikki // *Free Radical Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28. — P. 1538-1546.
19. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants / P.G. Pietta // *J Nat. Prod.* — 2000. — Vol. 63. — P. 1035-1042.
20. Seyoum A. Structure-radical scavenging relationships of flavonoids / A. Seyoum, K. Asres, F.K. El-Fiky // *Phytochemistry*. — 2006. — Vol. 67. — P. 2058-2070.
21. Shulga L.I. Correlation of the structural peculiarities of bioactive compounds of herbal remedy and its pharmacological value / L.I. Shulga // *Annals of Mechnikov Institute*. [Електронний ресурс]. — 2012. — № 2. — P. 71-75.
22. Singleton V.L. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // *Methods Enzymol.* — 1999. — Vol. 299. — P. 152-177.
23. Talcott S.T. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice / S.T. Talcott, J.H. Lee // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2002. — Vol. 50. — P. 3186-3192.
24. Young I.S. Antioxidants in health and disease / I.S. Young, J.V. Woodside // *J. Clin. Pathol.* — 2001. — Vol. 54, №3. — P.176-186.
25. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

#### Резюме

Шульга Л.И.

#### Антиоксидантный профиль нового растительного средства – исследования на модельных системах *in vitro*

Представлены результаты изучения антиоксидантной (антисупероксидной, антирадикальной, хелатирующей) активности сложной настоек методами *in vitro*. Выдвинуто предположение о том, что механизм антиоксидантного действия реализуется за счет участия биологически активных веществ, среди которых фенольные соединения, в связывании ионов  $Fe^{2+}$ , в ингибировании образования гидроксил-радикала ОН-и супероксидного анион-радикала  $O_2^{-1}$ .

**Ключевые слова:** исследования *in vitro*, антиоксидантная активность, фенольные соединения, сложная настойка

#### Summary

Shulga L.I.

#### Antioxidant profile of the new plant drug - a study on *in vitro* model systems

Data on the study of antioxidant (antisuperoxidizing, anti-radical, chelating) effect of complex tincture using *in vitro* methods. The assumption on the mechanism of antioxidant effect, implemented through the participation of biologically active compounds, including phenolic compounds in  $Fe^{2+}$  binding ions, inhibiting the formation of OH- hydroxyl radical and  $O_2^{-1}$  superoxide anion radical has been put forward.

**Key words:** methods *in vitro*, antioxidant effect, phenolic compounds, complex tincture.

**Шульга Людмила Іванівна.** Закінчила Українську фармацевтичну академію (1995). К.фарм.н. (2003). Доцент (2006). Доцент кафедри загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ.



## Фармакологічні дослідження

УДК 616-005.4 : 615.217.34:547.756

Цубанова Н.А.

Національний фармацевтичний університет

### Дослідження впливу спіроциклічного похідного оксіндолу на показники енергетичного обміну при експериментальній церебральній ішемії

Наведено результати впливу спіроциклічного похідного оксіндолу в дозі 5 мг/кг на церебральний енергетичний обмін в умовах гострої ішемії головного мозку. Встановлено, що нова сполука запобігає розвитку енергодефіциту на тлі модельної патології, підвищує рівень АТФ, зменшує накопичення АДФ, нормалізує активність ферментів дихального ланцюга. За впливом на показники енергетичного обміну досліджувана сполука вірогідно перевищує активність препарату порівняння мексидолу в дозі 100 мг/кг. Отримані результати свідчать про доцільність подальшого фармакологічного вивчення нової субстанції з метою розробки нового антигіпоксичного препарату метаболічної дії.

*Ключові слова:* спіроциклічне похідне оксіндолу, енергетичний обмін, фармакологічне вивчення.

Стан здоров'я населення України на сучасному етапі розвитку оцінюється як незадовільний: високий рівень загальної смертності, низький рівень очікуваної тривалості життя та низька тривалість життя без інвалідності (59.2 роки) [8]. Проведені в різних країнах дослідження виявляють чітку залежність між якістю організації медичної допомоги хворим на гострі порушення мозкового кровообігу (ГПМК) — однією з найважливіших і соціально значущих проблем сучасної медицини — та показниками смертності та інвалідності населення [2, 12, 16, 17]. У більшості країн світу ГПМК входять до першої трійки причин летальності, причому близько 30 % ГПМК призводять до смерті у гострому періоді. У 80 % хворих після перенесеного ГПМК реєструють різний ступінь обмежень у повсякденному житті та інвалідизацію [16, 17].

Відомо, що ішемія, із якої починаються клінічні прояви ГПМК, запускає розвиток багаточисельного комплексу патобіохімічних реакцій — ішемічного каскаду, найважливіше місце в якому займає порушення енергозабезпечення нейронів, активація перекисного окиснення ліпідів і деструкція нейрональних мембран [1]. Особливістю церебрального метаболізму є те, що він практично не має запасу енергетичних субстратів і потребує їх постійного постачання через мозковий кровообіг [14]. Це обумовлює раціональність включення до схеми лікування ішемічних уражень мозку метаболічних препаратів, здатних відновлювати енергетичний обмін поряд із своєчасним призначенням лікарських засобів стандартної терапії (антитромботичні, гіполіпідемічні препарати тощо) [9, 15].

Актуальним є пошук нових субстанцій, здатних ліквідувати церебральний енергетичний дефіцит, виявляти антигіпоксичну дію за умов гострої церебральної ішемії.

Перспективним в аспекті пошуку нових антигіпоксанів метаболічної дії є 4,3'-спіро[(2-

аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндолу], у подальшому сполука 77, що була синтезована у НФаУ к.ф.н. Редькіним Р.Г. та проф. Шемчуком Л.А., для якої у попередніх дослідженнях доведено значну антигіпоксичну активність [5].

Метою даної роботи було вивчення впливу нової сполуки на енергетичний обмін в умовах експериментальної церебральної ішемії для дослідження можливої метаболічної дії.

#### *Матеріали та методи*

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою (190-240) г. Сполуку 77 в дозі 5 мг/кг, що виявляє найбільший антигіпоксичний ефект [5], вводили щодня у шлунок протягом 3 діб, востаннє за (30-40) хв до моделювання порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом у передньомозковому басейні, що відтворювали під наркозом шляхом білатеральної каротидної оклюзії [6, 11]. Препарат порівняння мексидол (виробництва ТОВ «НВК «Фармасофт», Росія) у дозі 100 мг/кг вводили за аналогічною схемою.

Тварини групи інтактного контролю ( $n = 6$ ) отримували наркоз і були псевдооперовані (розріз шкіри на шиї, препарування сонних артерій без перев'язування, ушивання рани). Тварини групи контрольної патології ( $n = 6$ ) отримували наркоз і були оперовані відповідно до методики відтворення церебральної ішемії [6, 11]. Для цього під нембуталовим наркозом (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно) перев'язували загальні сонні артерії із двох боків, що значно обмежує кровопостачання головного мозку. За цих умов залишається лише кровообіг у басейні хребетних артерій, розвивається ішемія мозку та порушення енергетичного обміну. Для оцінки участі сполуки 77 в енергетичному обміні досліджували вміст макроергічних

фосфатів — АТФ, АДФ — у тканині головного мозку, за допомогою наборів реактивів фірми «Мангайм» (Німеччина). Для дослідження вмісту макроергів використовували метод Лампрехта і Тротшоляда [3, 6]. Принцип методу полягає в тому, що АТФ, що міститься у пробі, у присутності гексокінази фосфорилує глюкозу. Глюкозо-6-фосфат, що утворюється при цьому, у свою чергу, є субстратом для глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназної реакції.

#### Визначення активності цитратсинтази

Цитратсинтаза, як один із ключових ферментів циклу Кребса, каталізує реакцію конденсації ацетил-КоА й оксалоацетової кислоти з утворенням лимонної кислоти, реакція яка є першим ступенем циклу трикарбонних кислот, біосинтезу жирних кислот. Для визначення цитратсинтазної активності використовували метод, що ґрунтується на зміні оптичної густини (за довжини хвилі 340 нм) середовища від додавання малату, що окиснюється екзогенною малатдегідрогеназою до оксалоацетату, а останній вступає до реакції конденсації із ацетил-КоА [3,6].

#### Визначення активності піруватдегідрогенази

Піруватдегідрогеназа — мітохондріальна ферментативна система, що бере участь у метаболізмі пірвиноградної кислоти. Принцип методу визначення ферментативної активності: піруватдегідрогеназа здійснює окисне декарбоксілювання пірвату із одночасним відновленням НАД. Швидкість накопичення відновленої форми НАД, що є показником ферментативної активності піруватдегідрогенази, визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм [3, 6].

#### Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Сукцинатдегідрогеназа — флавопротеїд, у молекулі якого в якості коферменту знаходиться ковалентно зв'язаний флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Цей кофермент діє як акцептор  $H_2$ . Для визначення сукцинатдегідрогеназної активності використовували метод, що ґрунтується на зміні оптичної густини (за довжини хвилі 600 нм) 2,6-дихлорфеноміндофенолу (ДХФІФ), що відновлюється у присутності фенозинметасульфату (ФМС) при ферментативному окисненні сукцинату [3,6].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 6.0 із використанням критерія Ст'юдента.

#### *Результати та їх обговорення*

Глобальне обмеження обсягу кровообігу в мозку, викликане білатеральною каротидною оклюзією, індукує розвиток потужного церебрального енергодефіциту (Таблиця). Значне зниження у клітинах мозку кисню — кінцевого акцептора електронів — гальмує активність процесів окиснення-відновлення у дихальному ланцюзі та призводить до суттєвого зниження рівня АТФ [4]. Відомо, що ферменти дихального ланцюга та дегідрогенази циклу Кребса багато у чому визначають інтенсивність аеробного окиснення - основного шляху утворення енергії [3]. У зв'язку з цим було досліджено динаміку зсувів вмісту АТФ та її метаболіту АДФ.

У групи КП відбувається вірогідне зниження вмісту АТФ у 2 рази відносно інтактного контролю та одночасне збільшення рівня АДФ на 50 %. Порухення ферментативної активності енергетичних процесів верифіковано за достовірним зниженням активності цитратсинтази — в

Таблиця

**Вплив сполуки 77 і мексидолу на енергетичний обмін мозку щурів на тлі білатеральної каротидної оклюзії (n=6)**

Показник	Група			
	інтактний контроль	контрольна патологія	мексидол, 100 мг/кг	сполука 77, 5 мг/кг
АТФ, мкмоль/г	3.02±0.13	1.50±0.07***	2.04±0.10***#	2.38±0.08***##\$
АДФ, мкмоль/г	0.268±0.01	0.406±0.02**	0.328±0.01**#	0.297±0.01##\$
цитратсинтаза, нмоль/хв/мг білка	4.81±0.15	2.79±0.14***	3.25±0.11***#	3.91±0.09***##\$\$
сукцинатдегідрогеназа, нмоль/хв/мг білка	6.77±0.17	3.12±0.20***	4.47±0.25***##	5.43±0.17***##\$\$
піруватдегідрогеназа, мкмоль НАДН/хв/мг білка	28.8±1.25	14.7±0.67***	19.2±1.01**#	23.1±0.95***##\$\$

*Примітки:*

достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю \* — p<0.05; \*\* — p<0.01; \*\*\* — p<0.001; достовірні відмінності з показниками контрольної патології # — p<0.05; ## — p<0.01; ### — p<0.001; достовірні відмінності з показниками групи мексидолу \$\$ — p<0.05; \$\$\$ — p<0.01.

1.7 рази, сукцинатдегідрогенази - у 2,2 рази та піруватдегідрогенази — в 1,9 рази. Отримані результати підтверджуються літературними даними — за умов гострої ішемії реєструється суттєвий енергетичний дефіцит, зниження вмісту макроергічної сполуки АТФ, зменшення ферментативної активності цитратсинтази, сукцинат дегідрогеназиту піруватдегідрогенази, що призводить до значних нейродегенеративних пошкоджень [ 1, 4, 14].

Встановлено позитивну дію мексидолу на церебральний метаболізм в умовах гострої ішемії головного мозку, що підтверджено багаточисельними дослідженнями та пояснює його метаболічну дію. Антигіпоксичну дію мексидолу обумовлено наявністю в його структурі сукцинату, що за умов гіпоксії, надходить до клітини та окиснюється у дихальному ланцюзі, при цьому активує ендогенне дихання й енергосинтезуючу функцію мітохондрій [10]. Введення мексидолу вірогідно підвищує вміст АТФ ( $2.04 \pm 0.10$ ) мкмоль/г проти ( $1.50 \pm 0.07$ ) мкмоль/г у групі контрольної патології); знижує вміст АДФ і сприяє нормалізації активності ферментів дихального ланцюга.

Введення сполуки 77 значно покращувало показники церебрального енергетичного обміну за умов гострої ішемії. Встановлено вірогідне підвищення вмісту АТФ в 1.6 рази відносно групи КП, що достовірно перевищує активність мексидолу (зміна показника в 1.3 рази відносно групи КП). Що стосується активності ферментів енергетичного метаболізму, сполука 77 достовірно відновлювала їх дію. Це свідчить про потужну здатність нової сполуки попереджувати розвиток енергетичного дефіциту. Енергозберігаюча активність мексидолу вірогідно поступається дії нової сполуки.

### Висновки

На підставі одержаних даних можна зробити висновок про те, що спіроциклічне похідне оксидолу в дозі 5 мг/кг відновлює енергетичний обмін головного мозку за умов гострої церебральної ішемії. Потужна енергозберігаюча дія нової сполуки вірогідно перевищує таку препарату порівняння мексидолу в дозі 100 мг/кг.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Бурчинский С.Г. Возможности препаратов — фармакологических регуляторов энергетического обмена в ангионеврологии / С.Г. Бурчинский // Consilium-medicum Ukraina. — 2012. - № 4. - С. 6-9.
2. Зозуля І.С. Тактичні питання ведення хворих на гострий інфаркт мозку / Зозуля І.С., Слабкий Г.О., Зозуля А. І. // Український медичний часопис. — 2012. — № 1 (87) — С. 38-43.
3. Клінічна біохімія / Бойків Д.П., Бондарчук Т.І., Іванкув О.Л. та ін. / За ред. О.Я. Складярова. - К.: Медицина, 2006. - 432 с.

4. Нечипуренко Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко // Медицинские новости. - 2008. - № 1. — С. 34-38.
5. Пат. 87952 Україна, МПК С07D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, А61К 31/33, 31/404, 31/436, 31/437, 31/438. 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксидол], який проявляє антигіпоксичну активність: Пат. 87952 Україна, МПК С07D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, А61К 31/33, 31/404, 31/436, 31/437, 31/438 Р.Г. Редькін, Н.А. Цубанова, В.П. Черних.; НФаУ. - № 200815044; Заявл. 26.12.2008; Опубл. 25.08.2009, Бюл. № 16. — 8 с.
6. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. пособие. — Ленинград, 1982. — С. 272.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИИ «Ремедиум», 2000. — 398 с.
8. Лехан В.М. Стратегія розвитку системи охорони здоров'я: Український вимір / В.М. Лехан, Г.О. Слабкий, М.В. Шевченко. - Київ, 2009. — 34 с.
9. Фонакин А.В. Современные стратегии вторичной профилактики ишемического инсульта / А.В. Фонакин, Л.А. Гераскина // Consilium-medicum Ukraina. - 2012. - № 4. - С. 22-24.
10. Чуканова Е.И. Мексидол® в терапии недостаточности мозгового кровообращения / Е.И. Чуканова // Медицинский вестник. - 2009. - № 25-26. - С. 494-495.
11. Штриголь С.Ю. Модуляция фармакологических эффектов при различных солевых режимах: (Монография). — Х.: Ависта-ВАТ, 2007. — 360 с.
12. Donnan G.A. Multidisciplinary stroke management / G.A. Donnan // International Journal of Stroke. - 2012. - Vol. 7, № 6. - P. 275-276.
13. Kelly B.M. The stroke rehabilitation paradigm / B.M. Kelly, Jr.P.H. Pangilinan, G.M. Rodriguez // Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am. — 2007. — № 18. — P. 631-650.
14. Owen L. Metabolic therapy aimed at increasing the level of ATP in the cells can improve the cognitive function of the brain / L. Owen, S.I. Sunram-Lea // Nutrients. — 2011. — Vol. 3, № 8. — P. 735-755.
15. Stam J. Thrombosis of the Cerebral Veins and Sinuses / J. Stam // N. Engl. J. Med. — 2005. - Vol. 352. - P. 1791-1798.
16. Stroke / G.A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod et al. // Lancet. — 2009. — Vol. 371. — P. 1612-1623.
17. Vliet P. Targeting stroke treatment to the individual / P. Vliet, L. Carey, M. Nilsson // International Journal of Stroke. - 2012. - Vol. 7, № 6. - P. 480-482.

### Резюме

Цубанова Н.А.

### Изучение влияния спироциклического производного оксидола на показатели энергетического обмена при экспериментальной церебральной ишемии

Приведены результаты влияния спироциклического производного оксидола в дозе 5 мг/кг на церебральный энергетический обмен в условиях острой ишемии головного мозга. Установлено, что новое соединение предотвращает развитие энергодефицита на фоне модельной патологии, увеличивает уровень АТФ, уменьшает накопление АДФ, нормализует активность ферментов дыхательной цепи. Изучаемое соединение по влиянию на показатели энергетического обмена достоверно превышает активность препарата сравнения мексидолу в дозе 100 мг/кг. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего фармакологического изучения новой субстанции с целью разработки нового антигіпоксического препарата метаболіческого действия.

**Ключевые слова:** спироциклическое производное оксидола, энергетический обмен, фармакологическое изучение.

## Summary

Tsubanova N.A.

**The influence spirocyclic oxindolic derivative on parameters of the energy metabolism at experimental cerebral ischemia**

Data of the impact of spirocyclic oxindolic derivative at the dose of 5 mg/kg on cerebral energy metabolism in acute cerebral ischemia have been presented. It was found that the new compound prevented the development of energy deficit at disease model, increased ATP level, reduced the accumulation of ADP, and normalized the activity of respiratory chain enzymes. As for the effect on rates of energy metabolism, stud-

ied compound significantly exceeded the activity of the drug in comparison of Mexidol at the dose of 100 mg/kg. Obtained data indicated to the feasibility of further pharmacological study of a new substance for the development of a new antihypoxic drug with the metabolic effects.

*Key words:* spirocyclic oxindolic derivative, energy metabolism, pharmacological study.

**Цубанова Наталя Анатоліївна.** К.фарм.н. Доцент кафедри загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ.

УДК 615.466

Надеждин С.В., Турьев Г.В., Кирсанова П.О., Колесников Д.А., Любушкин Р.А., Даньшина Е.П.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

**Докулиническое исследование керамики из циркония диоксида на цитотоксичность и биосовместимость**

Керамика из циркония диоксида является перспективным материалом для стоматологии, травматологии и ортопедии. В настоящем исследовании дана оценка цитотоксичности и биосовместимости синтезированного в НИУ «БелГУ» порошка циркония диоксида. Несмотря на то, что результат исследования *in vitro* нельзя непосредственно перенести на условия *in vivo*, данное вещество может быть применено в клинической практике.

*Ключевые слова:* доклиническое исследование, цитотоксичность, биосовместимость, керамика, диоксид циркония.

В настоящее время рынок материалов для изготовления имплантатов и других конструкций постепенно смещается от металлических сплавов в сторону керамики. Среди всего разнообразия керамических материалов особенно выделяется циркония диоксид, как материал, обладающий высокой биосовместимостью и способностью сдерживать распространение микротрещин при чрезмерных нагрузках. Керамика на основе циркония диоксида нашла широкое применение в стоматологии для изготовления ортодонтических брекетов, корневых штифтов, каркасов протезов, а также имплантатов [2, 4, 5].

Целью данной работы является оценка цитотоксичности и биосовместимости синтезированного порошка циркония диоксида.

Порошок циркония диоксида синтезирован в Центре коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» с использованием метода химического осаждения из раствора вода - изопропанол (1:5). В качестве исходных реагентов использованы  $ZrO(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , и  $Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ . В качестве основного агента использовали водный раствор аммиака. Использованы растворы солей и осадителя с концентрацией 0.1 М, скорость подачи растворов солей подобрана таким образом, чтобы значение рН на протяжении всего

процесса осаждения составляло 9.5, осаждение проводили при энергичном перемешивании. Полученный гидрогель отделялся от маточного раствора, многократно промывался водой и спиртом и высушивался на воздухе при температуре 50 °С в течении 48 ч. После сушки  $Y_{0.08}Zr_{0.92}O_2$  для определения температуры кристаллизации, температуры фазовых переходов и подбора условий термической обработки получаемых нанопорошков был использован анализатор совмещенный ТГА/ДСК/ДТА (SDT Q600). Высушенный гидрогель  $Y_{0.08}Zr_{0.92}O_2$  прокаливался на воздухе при температуре 700 °С в течении 3.5 ч. По данным картотеки ICDD полученный образец является однофазным твердым раствором тетрагонального  $Y_xZr_{1-x}O_2$  с пространственной группой 137, P42/nmc (карточка №10704429 (ICDD)).

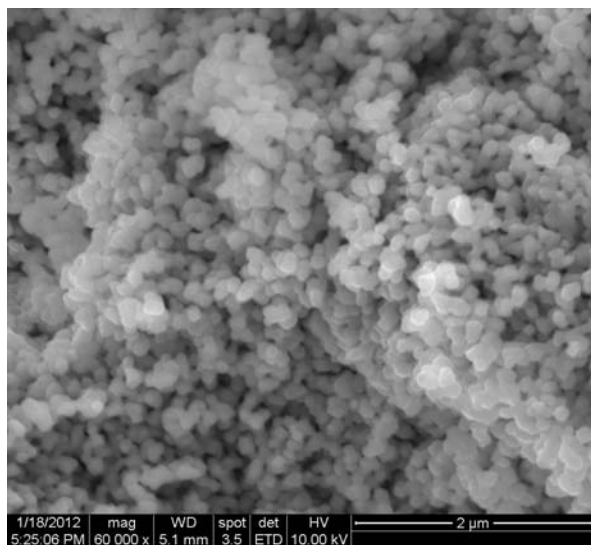
По данным просвечивающей электронной микроскопии, порошок  $Y_{0.08}Zr_{0.92}O_2$  состоит из частиц эллипсоидной формы со средним размером 20 нм. Изображения структуры порошка циркония диоксида, полученного с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ), показывают, что средний размер порошинок составляет около 70 нм (Рис. 1). Это свидетельствует о том, что отдельные порошинки состоят из субзерен.

Для оценки цитотоксичности использовали клетки красного костного мозга, выделенные

непосредственно перед проведением теста. Животных умерщвляли передозировкой парами эфира. Затем стерильно удаляли большеберцовые кости, с которых срезали мышцы и мягкую соединительную ткань, отсекали эпифизы, и выдували костный мозг струей физиологического раствора с помощью шприца в чашку Петри с питательной средой 199. На данном этапе работы исследования проводили согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*, методом прямого контакта.

По 0.0065 г порошка образца помещали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», прибавляли 1.5 мл питательной среды 199 и суспензию клеток костного мозга (по 3 повтора на каждый образец). Все пробы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в присутствии 5 % углерода диоксида в течении 3 ч. По истечении времени инкубации в чашках Петри и пробирках, содержащих исследуемые образцы с клетками костного мозга, заменяли питательную среду и прибавляли по 300 мкл и 150 мкл двухкомпонентного флуоресцентного раствора красителей (этидиум бромид (Helicon) и ацетооксиметилловый эфир кальцеина (Fluka)), соответственно. Все пробы с флуоресцентным красителем инкубировали в течение 5 мин в термостате при температуре 37 °С в присутствии углерода диоксида. После истечения времени инкубации по 150 мкл суспензии наносили на покровные стекла.

Рисунок 1



Структура порошка циркония диоксида

Применяли флуоресцентный метод анализа жизнеспособности клеток [4]. По результатам флуоресцентной/конфокальной лазерной сканирующей микроскопии определяли жизнеспособность клеток. На каждые 100 клеток подсчитывали количество живых (зеленая флуоресценция в цитоплазме) и мертвых клеток (красная флуоресценция в ядре). Сканирование образцов и последующий анализ проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера (488 нм) и режима Z-Stack (сканирование образца по осям X, Y, Z).

В результате анализа данных по цитотоксичности керамики циркония диоксида было установлено, что количество живых и мертвых клеток костного мозга в опытных пробах достоверно отличается от контрольной пробы (Таблица).

Таблица

**Количество живых и мертвых клеток костного мозга в опытных и контрольных пробах**

Проба \ Клетки	Живые клетки, шт.	Мертвые клетки, шт.
контрольная суспензия клеток	81.0±3.06	19.0±3.06
порошок циркония диоксида	67.7±4.49*	32,30±3.48

Примечание.

\* — достоверность различий по сравнению с контролем по критерию Стьюдента (p<0.01).

Жизнеспособность клеток костного мозга в опытных пробах равна 67 %, тогда как в контрольных пробах составила 81 %, что может быть связано с высокой абсорбирующей способностью частиц циркония диоксида.

Биосовместимость материала оценивали при помощи метода «Подкожной инокуляции» согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации». Опыты проведены на беспородных лабораторных белых крысах в количестве 12 особей (по 6 в контрольной и опытной группах). Все экспериментальные исследования с использованием животных проводили в соответствии с международными требованиями [3] и согласно ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

Циркония диоксид был имплантирован животным в виде кубиков неправильной формы размером 1.5 мм × 1.5 мм × 1 мм под кожу в про-

слойку соединительной ткани, расположенную на спине. После анестезии и обработки участка антисептическим раствором разрежали кожу подопытного животного. Тупым рассечением делали карман шириной 2 мм и глубиной 4 мм. В карман помещали один из образцов; рану обрабатывали спиртовым раствором специальной синтетической фенолформальдегидной смолы, поливинилбутирола и канифоли с добавлением пластификатора. Анализ биологической реакции проводили через 7 сут после имплантации.

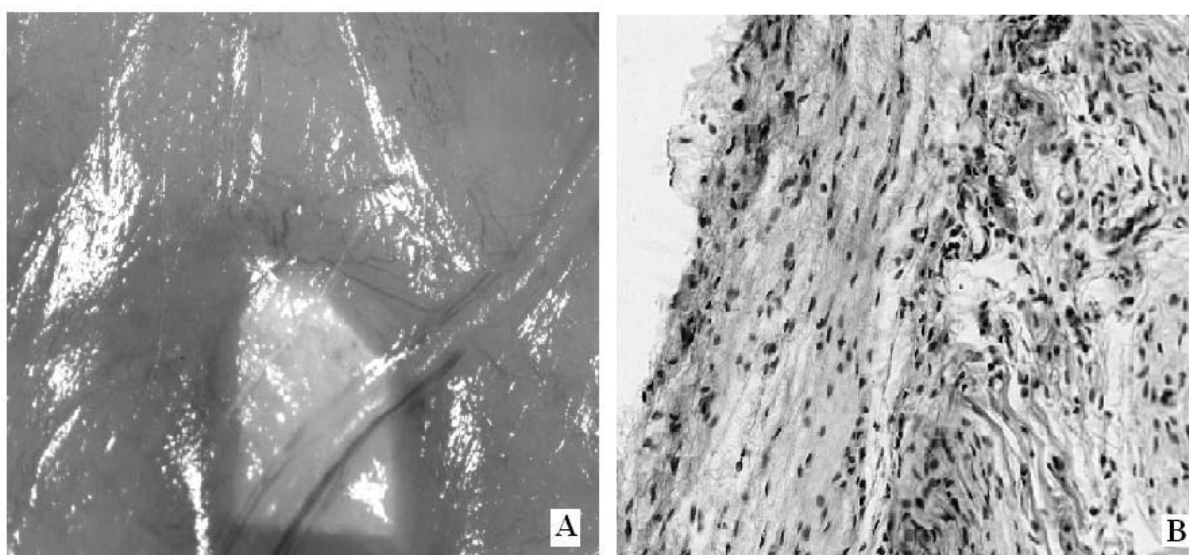
Местную реакцию соединительных тканей оценивали макро- и микроскопически. Степень реакции определяли измерением расстояния от поверхности соприкосновения имплантата с тканью до участков, имеющих характеристики интактной ткани с нормальным кровообращением. После макроскопического исследования проводили резекцию соединительной ткани зоны дефекта с образцами. Гистологические препараты соединительных тканей зоны дефекта готовили общепринятыми методами. Оценивали следующие параметры: степень фиброза и воспаления; дегенерацию окружающих тканей; наличие некроза; степень интеграции материала имплантата с соединительной тканью инокуляционной зоны. Объем регенераторного процесса (%) определяли при помощи сетки со 100 точками (81 квадрат = 100 %), вставленной в окуляр стереомикроскопа Leica EZ4D [1]. Гистологические препараты изучали при помощи аппаратно-программного комплекса

Видео-Тест-Размер (микроскоп AxioPlan plus фирмы «Zeiss»).

При макроскопическом изучении зон дефекта на коже животных внешние признаки местной асептической воспалительной реакции не выявлены во всех экспериментальных группах. В группе контроля нижележащие под кожей слои в зонах дефекта были без признаков дегенерации. Васкуляризация тканей умеренная, капилляры и мелкие сосуды полнокровны, пронизывают все соединительнотканые слои до поперечнополосатых мышц. В зоне дефекта у контрольной группы животных с внутренней стороны кожного лоскута отмечается умеренная васкуляризация ткани, что свидетельствует о завершении процессов регенерации. В соединительнотканном регенерате преобладают зрелые фибробласты над другими клеточными элементами; паренхима представлена волокнистыми структурами с продольной ориентацией. Степень реакции ткани на оперативное вмешательство была слабой и составляла менее 0.5 мм. Объем регенераторного процесса составил 10 % площади зоны дефекта.

В ходе исследования иссеченных кожных лоскутов опытной группы было выявлено наличие соединительнотканной капсулы вокруг кубика инокулированного материала. Капсула полностью повторяет контуры кубика. В ее паренхиме и ложе практически отсутствуют кровеносные капилляры. Было установлено завершение восстановительных процессов в регенерационной зоне дефекта. Окружающие

Рисунок 2



Тонкостенная соединительнотканная капсула, образовавшаяся вокруг кубика циркония диоксида с проходящим по ее поверхности кровеносным сосудом (А). Плотная грубоволокнистая соединительная ткань регенерационной зоны дефекта (В)

ткани не имеют признаков некротических и дегенеративных изменений. В соединительнотканном регенерате повсеместно встречаются зрелые фибробласты и фиброциты, соединительнотканная компонента представлена, преимущественно, волокнами плотной соединительной ткани, которые имеют продольную ориентацию (Рис. 2).

Степень реакции ткани на инокуляцию кубика циркония диоксида была слабой. Объем регенераторного процесса составил 20 % площади зоны дефекта.

### Выводы

Несмотря на то, что результат исследования *in vitro* нельзя непосредственно перенести на условия *in vivo*, данное вещество может быть применено в клинической практике.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблучанский, В.Г. Губенко. — М.: Медицина, 1981. — 192 с.
2. Лебедеко И.Ю. Руководство по ортопедической стоматологии. Протезирование при полном отсутствии зубов / И.Ю. Лебедеко, Э.С. Каливраджиян, Т.И. Ибрагимов. — М.: Медицинское информационное агентство, 2005. — 400 с.
3. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. — Режим доступа: [http://www.aaalac.org/resources/Guide\\_2010.pdf](http://www.aaalac.org/resources/Guide_2010.pdf).
4. Koutayas S.O. Zirconia in dentistry: part 2. Evidence-based clinical breakthrough / S.O. Koutayas, T. Vagkopoulou, S. Pelekanos, P. Koidis, J.R. Strub // Eur. J. Esthet. Dent. — 2009. — № 4. — P. 348–380.
5. Kohal Ralf-J. Zirconia-implant-supported all-ceramic crowns withstand long-term load: a pilot investigation / Kohal Ralf-J., Klaus Gerold, Strub Jörg R. // Clinical Oral Implants Research. — 2006. - Vol. 17, № 5. - P. 565–571.

### Резюме

Надеждін С.В., Турьев Г.В., Кірсанова П.О., Колесніков Д.О., Любушкін Р.О., Даньшина О.П.

### Доклінічне дослідження кераміки із цирконію діоксиду на цитотоксичність і біосумісність

Кераміка з цирконію діоксиду є перспективним матеріалом для стоматології, травматології й ортопедії. У даному дослідженні дано оцінку цитотоксичності та біосумісності синтезованого у Білгородському державному національному дослідному університеті порошку цирконію діоксиду. Незважаючи на те, що результат дослідження *in vitro* не можна безпосередньо перенести на умови *in vivo*, дана речовина може бути застосована у клінічній практиці.

**Ключові слова:** доклінічне дослідження, цитотоксичність, біосумісність, кераміка, цирконію діоксид.

**Надеждин Сергей Викторович.** К.б.н. Доцент. Доцент кафедри анатомії та фізіології живих організмів, керівник науково-дослідницького центру «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии» Белгородского национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ»).

**Турьев Григорий Валерьевич.** Студент НИУ «БелГУ».

**Кирсанова Полина Олеговна.** Студентка НИУ «БелГУ».

**Колесников Дмитрий Александрович.** К.т.н. Доцент. Зав. лабораторией электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа центра коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов».

**Любушкин Роман Александрович.** К.х.н. Зав. лабораторией аналитического контроля центра коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов».

**Даньшина Елена Павловна.** К.ф.-м.н. Науч. сотр. центра коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ» «Диагностика структуры и свойств наноматериалов».

## Організація діяльності фармацевтичних підприємств

УДК 615.1:330.131.7

Євтушенко О.М., Мнушко З.М.  
Національний фармацевтичний університет

### Складові управління ризиками у сучасній фармації

Показано актуальність вивчення ризиків у фармації, а також доцільність і важливість використання системи ризик-менеджменту у комерційній діяльності. Виявлено низку ризиків, обумовлених специфікою галузі, особливостями самого товару та його споживання, що трапляються найчастіше у фармації або мають особливості у наслідках реалізації ризиків.

*Ключові слова:* фармація, ризики, управління, якість.

Сучасні умови господарювання в Україні характеризуються економічною та політичною нестабільністю, високим ступенем конкуренції, що додає підприємницькій діяльності елементи невизначеності, породжує можливість неочікуваних збитків, розширює межі ризику, підвищує його ступінь. Як показує практика, будь-яка фармацевтична організація є джерелом небезпеки з економічної, екологічної, соціальної точки зору. Але фармацевтичний бізнес свідомо приймає ризик за адекватну винагороду у вигляді прибутку, зазвичай, за наявності постійного моніторингу й управління небезпекою.

Дії щодо відстеження та запобігання можливій небезпеці сконцентровано у системі управління ризиками, що повинна включатися до системи менеджменту. Вона забезпечує ефективність комерційної діяльності, дозволяє організації вчасно відреагувати на внутрішні та зовнішні зміни, тим самим знизити вірогідність фінансових, матеріальних, моральних, людських та інших втрат [1-3].

Усе вищезазначене підтверджує тезу про те, що назріла необхідність адаптації механізму управління сучасними ризиками до практичної діяльності фармацевтичних організацій.

Метою даної роботи є аналіз інформаційних джерел із питань класифікації ризиків, а також дослідження ризиків, характерних для фармацевтичної галузі.

У теоретичній базі набір заходів, що допомагає управляти ситуацією невизначеності або запобігати їй, має назву «ризик-менеджмент» (англ. risk management). За кордоном ризик-менеджмент давно визнаний дієвим інструментом сучасного управління. Проте, становлення та розвиток ризик-менеджменту на Заході відбувається в умовах, украй відмінних від українських: інформаційна насиченість ринку, формалізовані процедури та відпрацьовані техніки управління, застосування сучасних інформаційних технологій дозволяють легше орієнтуватися у часі та ситуації. Тим більше, що передбачення тих або інших подій певним чином залежить від рівня поінформованості [5].

Таблиця 1

#### Основні риси нової та старої парадигм ризик-менеджменту

Стара парадигма	Нова парадигма
Ризик — загроза втрат у вигляді додаткових витрат або отримання доходів нижче очікуваних	Ризик — математичне очікування втрат, що реалізуються в результаті обраного рішення
Фрагментований ризик-менеджмент: кожен відділ самостійно управляє ризиками (у відповідності зі своїми функціями). Насамперед, це відноситься до бухгалтерії, фінансового відділу	Інтегрований, об'єднаний ризик-менеджмент: управління ризиками координується вищим керівництвом; кожен співробітник організації розглядає ризик-менеджмент як частину своєї роботи
Епізодичний ризик-менеджмент: управління ризиками здійснюється за необхідністю	Стратегічний ризик-менеджмент: заснований на прогнозуванні ризиків, розглядається як безперервний процес
Обмежений ризик-менеджмент: охоплює, перш за все, ризики, що можуть бути застраховані та ті, що фінансуються	Розширений ризик-менеджмент: розглядаються всі ризики та можливості їх організації, стратегічний менеджмент
Ризики розглядаються як загроза стабільному існуванню організації	Розглядається не тільки негативний, але й позитивний характер ризиків



За останні роки українські підприємці змінили погляди та підходи щодо управління ризиком, триває процес переорієнтації вітчизняного менеджменту на профілактику несприятливих ситуацій і створення максимально дієвої системи управління ними. Так, раніше підприємства використовували систему ризик-менеджменту епізодично й в обмеженому обсязі. Нові тенденції в економіці примушують керівництво фармацевтичних організацій переходити до нової парадигми, використовуючи ризик-менеджмент інтегровано та безперервно. Новий підхід полягає в орієнтуванні службовців і менеджерів усіх рівнів на ризик-менеджмент. У Табл. 1. представлено основні риси нової та старої парадигм ризик-менеджменту [8, 9].

У зв'язку з актуальністю визначених вище питань, було проведено анкетування керівників 267 роздрібних фармацевтичних підприємств України та 76 оптових підприємств із метою систематизації характерних для фармації ризиків і визначення ступеня їх загрози.

Ці дослідження дозволили визначити види та характер ризиків, що супроводжують фармацевтичну діяльність і виявити групу специфічних ризиків, пов'язаних з особливостями галузі, споживача та самого товару — лікарських засобів (ЛЗ). Так, за результатами експертного опитування визначено наявність політичних, фінансових, міжнародних, технічних, постачальницьких, інноваційних ризиків, ризиків виробництва, комерційних, управлінських, лізингових, адміністративно-законодавчих, соціальних, екологічних, демографічних і специфічних ризиків, пов'язаних з особливостями галузі. Запропоновано таку класифікацію ризиків у фармації (Рис. 1).

Деякі види ризиків вимагають особливого аналізу, оскільки мають специфічні риси, обумовлені особливостями виробництва та реалізації ЛЗ. Наприклад, ризики науково-дослідних і дослідницько-конструкторських робіт, що входять до складу виробничих ризиків, містять: переривання фінансування досліджень;

Рисунок 1

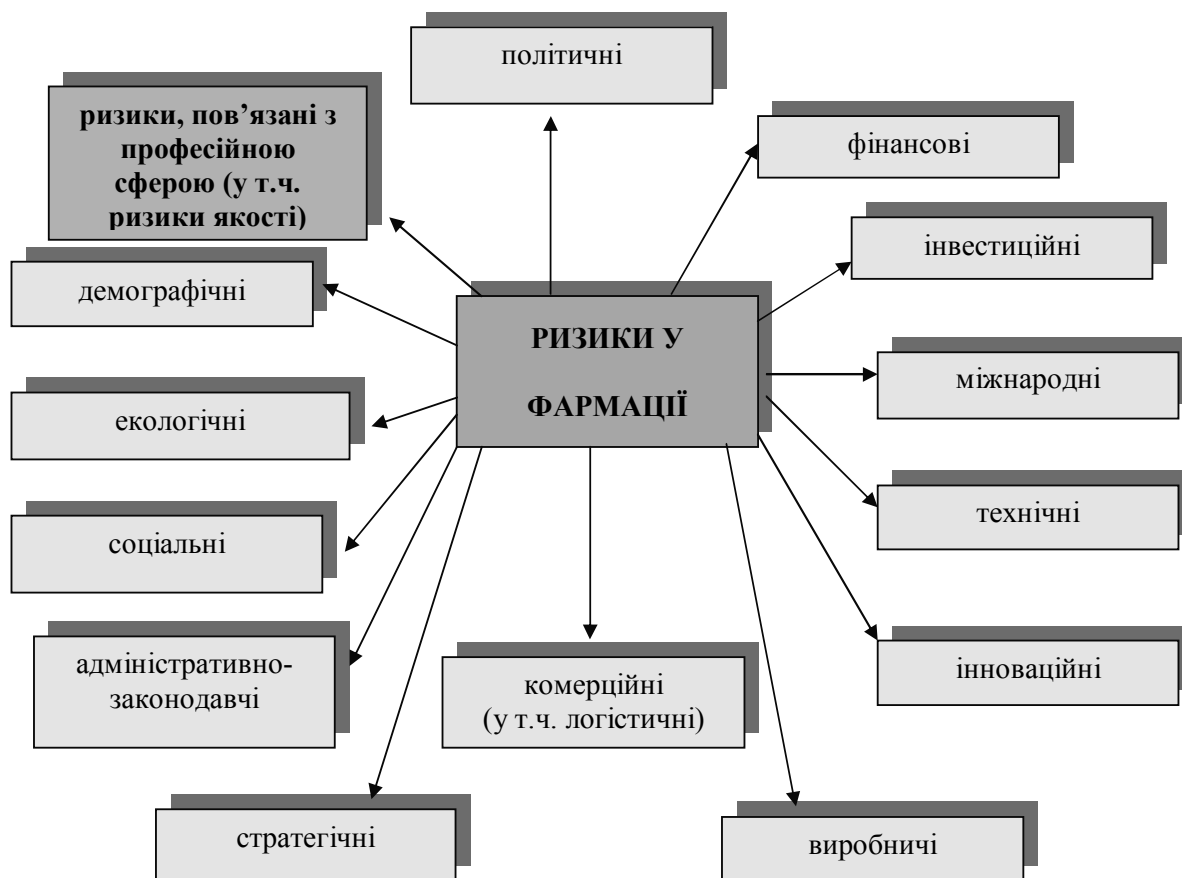


Схема ризиків, характерних для фармацевтичної галузі

перевищення кошторису витрат; зниження інвестиційної вартості проекту; одержання негативних результатів досліджень; недосягнення запланованих параметрів (ефективності, безпеки, властивостей тощо) ЛЗ; виникнення різного роду проблем при використанні нових технологій; виявлення негативних наслідків застосування ЛЗ [4, 10].

Окрім класичних видів ризиків, властивих діяльності будь-якого підприємства, існують загрози, що відокремлюють фармацевтичну галузь від будь-якої іншої. Узагальнення отриманих результатів та аналіз літературних джерел дозволили виявити низку ризиків, обумовлених специфікою галузі, особливостями самого товару та його споживання, що трапляються найчастіше у фармацевтії або мають особливості у наслідках реалізації ризиків. До цієї *специфічної групи ризиків, пов'язаних з професійною сферою*, на наш погляд, можуть бути віднесені:

- ризик невідповідності якості ЛЗ, що надійшли до роздрібно́ї мережі, вимогам Методик контролю якості;
- ризики невідповідної біоеквівалентності ЛЗ;
- виявлення негативних наслідків застосування ЛЗ;
- нераціональне призначення ЛЗ лікарями;
- відхилення від прогнозного рівня захворюваності;
- відсутність у лікарів і населення необхідної інформації про ЛЗ та їх застосування, неправильне її трактування;
- невідповідність вимог міжнародного та внутрішнього ринків до виробництва і якості ЛЗ;
- ризики паралельного патентування ЛЗ та нелегальної імітації ЛЗ;
- ризик формування не повного пакету охоронних документів щодо захисту об'єктів інтелектуальної власності, пов'язаних зі створенням ЛЗ;
- недосягнення запланованих параметрів (ефективності, безпеки, властивостей тощо) при розробці ЛЗ;
- одержання негативних результатів доклінічних, клінічних досліджень;
- ризики для людей, які беруть участь у клінічних дослідженнях;
- зміна фізико-хімічних параметрів ЛЗ через порушення або недосконалість технологічного процесу;
- виникнення різного роду проблем валідації нових технологій;
- псування або зміна властивостей субстанції через порушення умов зберігання;

- відсутність постачальників фармацевтичних субстанцій необхідної якості;
- перевитрачання субстанції внаслідок її низької якості;
- ризик нещасного випадку на виробництві або професійних захворювань через недотримання правил техніки безпеки;
- недостатній рівень кваліфікації персоналу.

Особливу увагу привертають ризики якості, що супроводжують як процес виробництва ЛЗ, так і інші етапи товарообігу. Вони можуть бути віднесені до виробничих або комерційних ризиків, але, на наш погляд, у зв'язку з важливістю проблеми доцільно цей вид ризиків віднести до особливих ризиків, пов'язаних із професійною сферою. Ризики, пов'язані з якістю ЛЗ, його ефективністю та безпекою, можуть виникати на будь-якому етапі життєвого циклу товару. Необхідність урахування цих ризиків зазначена у достатній кількості міжнародних і вітчизняних законодавчих і регуляторних документів: ІСН (Q8, Q9 і Q10), правилах GMP, розпорядженні Кабінету міністрів України від 10.09.08 р. №1247-р «Про затвердження Плану заходів щодо удосконалення державного контролю за обігом лікарських засобів і виробів медичного призначення» тощо. Особливий наголос робиться на сучасній ролі фармацевта у системі охорони здоров'я та забезпечення якісної фармацевтичної допомоги. Цей факт відображено у положеннях настанов ВООЗ та Міжнародної фармацевтичної федерації «Стандарти якості фармацевтичного обслуговування. Належна аптечна практика» 1997 р. (Good Pharmacy Practise), наказі МОЗ України №158 від 22.02.10 р. «Про затвердження протоколів провізора (фармацевта)», положенні «Належної практики фармацевтичної освіти» (Good pharmacy education practice), розробленому ВООЗ та Міжнародною фармацевтичною федерацією, де мається на меті широке залучення фармацевтів до роботи системи охорони здоров'я, активне застосування їх глибоких академічних знань для проведення раціональної фармакотерапії та забезпечення належного рівня фармацевтичної опіки [7]. Вищезазначені документи є суттєвим кроком до забезпечення всесвітніх стандартів якості на різних рівнях товарообігу ЛЗ і сприяють зниженню кількості та ступеню різноманітних ризиків у цій сфері.

Відомо, що негативна дія ліків залежить від багатьох факторів, серед яких найбільш важливими є:

- правильність виготовлення (відповідно до сучасних стандартів);

- раціональне використання та правильне введення в організм хворого;
- несумісність організму людини з ліками [4].

Побічні реакції є суттєвим ризиком, у першу чергу, для хворого, їх фінансові, матеріальні та моральні наслідки несуть загрозу самому підприємству-виробнику та, взагалі, державній системі охорони здоров'я. У майбутньому вибір серед великої кількості конкуруючих ЛЗ буде здійснюватись саме за рівнем якості препарату, у першу чергу, за рівнем ефективності та безпеки. Тому система ризик-менеджменту та, зокрема, система управління якістю на фармацевтичних підприємствах стає життєво необхідним елементом управління. Ризик-менеджмент не пропонує готових рішень, але дає системний підхід до оцінки ризиків конкретних підприємств і дозволяє за рахунок здійснення превентивних заходів знизити вірогідність настання негативних наслідків і зменшити масштаб можливого збитку.

Вищезазначене дозволяє акцентувати увагу на необхідності вивчення та групування галузевих ризиків, розробки та впровадження інструментів маркетингу та ризик-менеджменту як на державному рівні, так і на рівні фармацевтичної організації, на найбільш небезпечних ділянках роботи, зокрема, на усіх ринкових етапах обігу ЛЗ.

#### Висновки

Внаслідок аналізу положень теорії ризиків узагальнено теоретичну базу підприємницького ризику, розглянуто основні підходи до класифікації та управління ризиками, визначено їх структуру.

Виділено та проілюстровано на прикладах існування ризиків, пов'язаних із професійною фармацевтичною сферою. Серед них можна відзначити: нераціональне призначення ЛЗ лікарями, виявлення негативних наслідків застосування ЛЗ, недосягнення запланованих параметрів (ефективності, безпеки тощо) при розробці ЛЗ, ризики, пов'язані з невідповідною біоеквівалентністю генеричних ЛЗ та інші.

Питання дослідження ризиків у фармацевтичній сфері потребують подальшого опрацювання у напрямку інноваційної й інвестиційної діяльності фармацевтичних підприємств.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Альгин А.П. Грани экономического риска / А.П. Альгин — М.: Знание, 1991. — 342 с.
2. Ансофф И. Стратегическое управление / И. Ансофф — М.: Экономика, 1989. — 483 с.
3. Балабанов И.Т. Риск-менеджмент / И.Т. Балабанов. — М.: Финансы и статистика, 1996. — 192 с.
4. Безопасность лекарств. Руководство по фармаконадзору / Под ред. А.П. Викторова, В.И. Мальцева, Ю.Б. Белосова. — К.: МОРИОН, 2007. — 240 с.
5. Камінський А.Б. Економічний ризик та методи його вимірювання / А.Б. Камінський. — К.: Вид. дім «Козаки», 2002. — 120 с.
6. Посібник Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВОЗ) та Міжнародної фармацевтичної федерації (МФФ) // Еже-недельник Аптека. — 2009. — № 707(36). — [Електронний ресурс]. — Режим доступу до журналу: <http://www.apteka.ua/article/30596> — Заголовок з екрану.
7. Choi B.K. A method for comparing and combining cost-of-illness studies: an example from cardiovascular disease / B.K. Choi, A.W. Pak // Chronic Dis. Can. — 2002. — № 23 (2). — P. 47–57.
8. James W. Deloach. Enterprise-wide Risk Management: Strategies for linking risk and opportunity / James W. Deloach. — Chicago: Paperback, 2000. — 300 p.
9. Hirt J. Fundamentals of Investment Management / J. Hirt, S. Block. — Boston: Sun L., 1993. — 371 p.
10. Lazarou J. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies / J. Lazarou // JAMA. — 1998. — Vol. 279, № 4. — P. 1200–1205.

#### Резюме

Евтушенко Е.Н., Мнушко З.Н.

#### Составляющие управления рисками в современной фармации

Показана актуальность изучения рисков в фармации, а также целесообразность и важность использования системы риск-менеджмента в коммерческой деятельности. Выявлен ряд рисков, обусловленных спецификой отрасли, особенностями самого товара и его потребления, которые часто встречаются или имеют особые последствия реализации.

**Ключевые слова:** фармация, риски, управление, качество.

#### Summary

Yevtushenko O.M., Mnushko Z.M.

#### Components of risks management in the modern pharmacy

An actuality of a study risks in pharmacy, as well as the feasibility and importance of using risk-management system in the business have been demonstrated. A number of risks due to specific industry characteristics of the product itself and its consumption that occurred most often in the pharmacy or had features of consequences of risks have been revealed.

**Key words:** pharmacy, risks, management, quality.

**Евтушенко Олена Миколаївна.** К.фарм.н. Доцент кафедри менеджменту та маркетингу у фармацевтичній сфері НФаУ.

**Мнушко Зоя Миколаївна.** Заслужений діяч науки та техніки України. Д.фарм.н. Професор. Зав. кафедри менеджменту та маркетингу у фармацевтичній сфері НФаУ.

## Фармако-економічні та маркетингові дослідження

УДК 615.1-051:[339.138:17]

Ткаченко Н.О., Книш Є.Г., Червоненко Н.М.  
Запорізький державний медичний університет

### Вивчення інформованості фахівців фармації з питань соціально-етичного маркетингу

Досліджено проблему обізнаності фахівців фармації із питань соціально-етичного маркетингу.

*Ключові слова:* фармація, інформованість, соціально-етичний маркетинг.

Фармація — соціально значуща галузь на-родного господарства, від стану якої залежить національна безпека країни, здоров'я нації. Світовим ринком фармацевтичної продукції є складна, багаторівнева, поліфункціональна система зі стабільно високими темпами зростання виробництва, продажів і, відповідно, показниками рентабельності. Причини цього прості й зрозумілі: специфіка лікарських препаратів, як товарної категорії, така, що попит на них зростає незалежно від економічних і політичних чинників [4].

У цілому, можна констатувати, що після більш ніж тривалого періоду виключно високих темпів зростання фармацевтичної індустрії, у даний час підприємства стикаються зі зростаючою конкуренцією на ринку. В умовах сьогодення мережа конкурентів велика та насичена, і набір комунікаційних засобів, що використовується компаніями, майже аналогічний. Характер конкуренції тяжіє до використання переваг іміджу компаній, тобто тих соціопсихологічних характеристик, що формують сприятливе відношення споживачів і позитивне сприйняття компанії.

Сучасний фармацевтичний маркетинг не може бути пасивним відносно змін у зовнішньому середовищі. Певні історичні періоди генезису маркетингу характеризувалися акцентом на ту або іншу концепцію його розвитку, що відповідає соціальним, економічним і політичним змінам у суспільстві. Сьогодні увага більше переноситься із концепції виробництва та товарів на комерційні зусилля, на споживача та соціальну етичність [2, 3, 6].

Однак, ще наприкінці ХХ сторіччя було доведено неспроможність класичного маркетингу у фармації. Актуальності набувають інші концепції маркетингу — соціально-етичний та холістичний маркетинг, що спрямовують роботу фармацевтичних підприємств у русло соціальної відповідальності та виконання етичних норм [1, 5].

На жаль, стихійна інтеграція вітчизняної фармації у ринкові умови, призвела до надмірної комерціалізації та зниження її загальносоціальної ефективності. В Україні сформувалися протиріччя між ринковою формою фармації та її соціоцентричною природою. Вирішення цих протиріч залежить від становлення та реформування сучасної системи охорони здоров'я та її невід'ємної частини — фармації [7, 8, 9].

Метою даної роботи є дослідження розуміння та відношення фахівців фармацевтичної галузі до концепції соціально-етичного маркетингу, використання його елементів у практичній діяльності.

#### *Матеріали та методи*

Збір інформації здійснювався методом анкетування. Структура розробленої анкети передбачала умовне розділення питань на два блоки.

Перший блок питань анкети передбачав характеристику респондентів за демографічними та психологічними критеріями: стать, вік, освіта, посада, стаж роботи, форма власності підприємства.

Другий блок питань надавав можливість визначити рівень розуміння концепції соціально-етичного маркетингу та використання його елементів у практичній діяльності.

Досліджували суб'єкти роздрібно й оптової реалізації лікарських засобів фармацевтичного ринку різних форм власності. Апробація анкет здійснювалася на прикладі анкетування працівників аптек і оптових компаній м. Запоріжжя.

Як респонденти виступали фахівці фармацевтичного профілю у процесі своєї професійної діяльності, а також слухачі курсів підвищення кваліфікації.

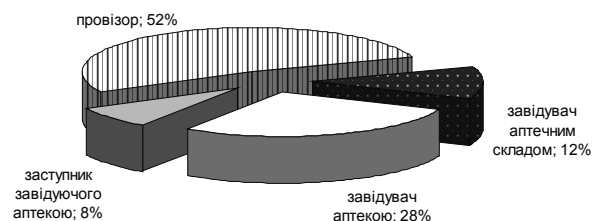
#### *Результати досліджень та їх обговорення*

Дослідження показали, що серед опитаних переважну більшість становлять жінки — 88.5 %.

Отримані результати свідчать, що основну частку респондентів складають фахівці у віці (30-40) років — 48 %. Далі респонденти за віковим критерієм розподілилися таким чином: 24 % склали особи у віці до 30 років, 16 % - старше 50 років, 12 % - від 30 до 40 років. Дослідження показали, що серед опитаних фахівці фармації у віці до 40 років становлять 72 %.

У результаті обробки анкет визначено, що всі респонденти мають вищу спеціальну освіту. Серед них 48 % - завідувачі та заступники завідувачів аптек, оптових фірм, 52 % - провізори (Рис. 1).

Рисунок 1



**Розподіл респондентів згідно посади**

Вивчення місця здійснення фармацевтичної діяльності спеціалістів показало, що вони працюють переважно на фармацевтичних підприємствах приватної форми власності (88 %). Лише 8 % — співробітники аптек із колективною формою власності, 4 % — комунальною.

Другий блок анкети складався з низки запитань, запропонованих для з'ясування інформованості спеціалістів фармації про соціально-етичний маркетинг.

Перше питання передбачало з'ясувати, що мають на увазі провізори під поняттям «соціально-етичний маркетинг». Слід зазначити, що на це питання змогли відповісти тільки респонденти зі стажем роботи до 10 років у віці (30-40) років. Однак, не дивлячись на це, позитивна відповідь на друге питання: «Чи відомо Вам про якісь соціально – етичні програми, що проводяться фармацевтичними компаніями України та зарубіжними компаніями?» була надана лише 8 % респондентів. Інші спеціалісти зовсім не дали відповіді на це питання.

Третє питання включало перелік 12 напрямів етичного маркетингу, що можуть, на думку респондентів, використовуватись фармацевтичними підприємствами, де вони працюють. Із запропонованих в анкеті напрямів здійснення етичного маркетингу анкетовані відзначили вісім.

У результаті аналізу з'ясовано, що найвищий показник серед перелічених у анкеті напрямів належить напрямку «Участь у добродійних заходах» — 50 %. Далі йдеє напрям «Пасивна

участь у соціальних програмах регіонального рівня» — 34 %. Напрями «Активна участь у соціальних програмах регіонального рівня», «Спонсорська допомога конкретним людям і окремим організаціям», «Організація передоплати або фінансова підтримка періодичних медичних (фармацевтичних) видань для фахівців» — склали по 24 %; «Фінансування поїздки медичних і фармацевтичних спеціалістів на вітчизняні та світові конгреси, конференції» відзначили 16 % анкетованих. Незначну частину відповідей дали респонденти за напрямками «Підтримка студентської молоді» та «Надання гуманітарної допомоги у вигляді лікарських засобів ЛПЗ, дитбудинкам і притулком для людей похилого віку» (Рис. 2).

Чергове питання передбачало з'ясувати, чи бажають провізори підвищити свою інформованість із питань соціально-етичного маркетингу. Аналіз анкет показав, що 47 % респондентів дали позитивну відповідь на це питання. Така ж частина фахівців (47 %) мала труднощі при відповіді на це питання. Категорична негативна відповідь була дана 6 % анкетованих. У результаті обробки анкет двох останніх груп респондентів встановлено, що це особи у віці понад 40 років і зі стажем роботи більше 10 років.

Останнє питання анкети мало метою з'ясувати думку респондентів фармації щодо участі під-

Рисунок 2



**Розподіл відповідей респондентів стосовно основних елементів етичного маркетингу, що можуть використовувати у своїй роботі фармацевтичні підприємства**

приємств фармацевтичної галузі у вирішенні соціальних проблем країни. Результати аналізу відповідей на це питання розподілилися таким чином: 24 % опитаних вважають, що участь у рішенні зазначених в анкеті проблем обов'язкова для оптових, роздрібних компаній і фірм-виробників. Обов'язкову участь у рішенні соціальних задач 6 % анкетованих бачать тільки для роздрібних компаній. Значна частина фахівців (58 %) відзначили, що це вибір самої компанії. 12 % респондентів не змогли дати відповідь на це питання.

#### Висновки

Рівень інформованості провізорів із питань соціально-етичного маркетингу не відповідає реаліям сучасного економічного розвитку країни.

Слід приділяти достатню увагу питанням соціально-етичного характеру у процесі підготовки кваліфікованих фахівців для фармацевтичної галузі.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Котвіцька А.А. Наукові підходи щодо моделювання розвитку соціальної політики у сфері лікарського забезпечення населення / А.А. Котвіцька // Запоріжський медичний журнал. — 2008. — № 2. — С. 157-161.
2. Котлер Ф. Основы маркетинга: Пер. с англ. / Под. общ. ред. Е.М. Пеньковой. - М.: Прогресс, 1990. - 736 с.
3. Котлер Ф. Основы маркетинга. Краткий курс / Ф. Котлер. - М.: Изд-во Вильямс, 2007. — 656 с.
4. Скакун М.П. Основы доказательной медицины / М.П. Скакун. - Тернопіль: «Укрмедкнига», 2005. — 242 с.
5. Струтинська Н.В. Сучасні напрямки розвитку маркетингу [Електронний ресурс] / Н.В. Струтинська. - Режим доступу: <http://www.sworld.com.ua/index.php/ru/management-and-marketing/policies-and-practices-of-marketing-in-the-enterprise/3669-strupinska-nv>
6. Тищенко О.О. Соціально-етичний маркетинг: сутність, елементи, чинники розвитку / О.О.Тищенко // Держава та регіони. Сер. : Економіка та підприємництво. — 2011. - № 16. - С. 204-208.
7. Ткаченко Н.О. Історичні аспекти становлення соціального маркетингу у фармації / Н.О. Ткаченко, Н. М. Червоненко // Запоріжський медичний журнал. - 2012. - № 2 (71). - С. 107-110.
8. Толочко В.А. Загальні аспекти та специфіка вітчизняного фармацевтичного маркетингу [Електронний ресурс] / В.А. Толочко, Ю.П. Медведєва, Л.В. Галій // Провізор. — 2008. - № 5. - Режим доступу: [http://www.provisor.com.ua/archive/2008/N05/tol\\_mark58.php](http://www.provisor.com.ua/archive/2008/N05/tol_mark58.php)
9. Формування Національної лікарської політики за умов впровадження медичного страхування: питання освіти, теорії та практики: Матеріали 2-ї Всеукраїнської наук.-освітньої інтернет-конф., 14 березня 2012. — Х. : МОЗ України, НФаУ. - 254 с.

#### Резюме

Ткаченко Н.А., Кныш Е.Г., Червоненко Н.М.

#### Изучение информированности специалистов фармации по вопросам социально-этического маркетинга

Исследована проблема осведомленности специалистов фармации по вопросам социально-этического маркетинга.

*Ключевые слова:* фармация, информированность, социально-этический маркетинг.

#### Summary

Tkachenko N.A., Knysh E.G., Chervonenko N.M.

#### Study of an awareness of pharmacy specialists on social and ethical marketing

A matter of an awareness of pharmacy specialists on social and ethical marketing has been studied.

*Key words:* pharmacy, awareness, social and ethical marketing.

**Ткаченко Наталія Олександрівна.** Доцент кафедри управління і економіки фармації Запорізького державного медичного університету (1998). К.фарм.н. (1997). Доцент (2002).

**Кныш Євген Григорович.** Завідувач кафедри управління і економіки фармації Запорізького державного медичного університету (1997). Д.фарм.н.(1988). Професор (1989).

**Червоненко Наталія Михайлівна.** Доцент кафедри управління і економіки фармації Запорізького державного медичного університету (2007). К.фарм.н. (1995). Доцент (2011).

---

**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 ДАК 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 убудований до MS Word (Microsoft Equation 3.0.).

---

11. Вимоги до ілюстративного матеріалу:

- ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті та мають бути підписаними;
- графіки, діаграми та ін. краще будувати у табличному редакторі Excel 97. Якщо даний ілюстративний матеріал створений за допомогою інших програм, зображення слід подавати у векторному форматі WMF. Так як журнал видається у чорно-білому виконанні, графіки мають бути виконані з відповідними відтінками;
- на графіках мають бути зазначені експериментальні точки;
- фотографії, файли із растровими зображеннями мають бути високої якості та не мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар та ін.). Формати файлів TIFF, BMP;
- криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки;
- структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані 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.