

Зміст

До 75-річчя з дня народження Чайки Леоніда Олександровича	5
<u>Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості</u>	
<i>Андрющенко Т. Л., Верушкін О. Г., Куліков А. Ю., Верушкіна О. С.</i> Розробка та валідація методики кількісного визначення алантоїну в препараті «Йодиксол» методом обернено-фазової ВЕРХ.....	7
<i>Бурмака О. В., Гурєєва С. М., Маргітич В. М.</i> Розробка методики контролю супровідних домішок субстанції енісаміуму йодиду.....	17
<i>Зінченко І. О., Ляпунов М. О., Безугла О. П.</i> Валідація аналітичної методики кількісного визначення домішок кетопрофену методом рідинної хроматографії.....	25
<i>Ляпунова А. М., Безугла О. П., Шишкіна С. В., Баумер В. М.</i> Дослідження деяких фізико-хімічних властивостей мометазону фуuratoу безводного та мометазону фуuratoу моногідрату	33
<i>Назарова О. С., Вербова Ю. М., Алмакаєва Л. Г., Бегунова Н. В., Доля В. Г.</i> Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки комбінованого оригінального препарату в формі розчину для інфузій для лікування критичних станів різної етіології	46
<u>Фармакологічні дослідження</u>	
<i>Гугзь Н. І., Кобилінська Л. І., Філіпська А. М., Дмитруха Н. М., Лагутіна О. С., Коритнюк Р. С.</i> Визначення життєздатності клітин під час фармацевтичної розробки розчинів для перитонеального діалізу.....	54
<i>Кишинець Н. В., Маслова Н. Ф.</i> Вивчення впливу препарату «Бронхофіт», настойка складна, на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи щурів в умовах експериментального альвеоліту.....	64
<u>Аналітичний огляд</u>	
<i>Меркулова Ю. В.</i> Пірогенна реакція та пірогени як складова проблеми безпечності парентеральних препаратів	69
<u>До відома авторів журналу «Фармаком»</u>	
Вимоги до публікацій.....	78

-
- Рецензенти: чл.-кор. НАНУ, д. фарм. н., професор Георгієвський В. П.;
д. фарм. н., ст. наук. співр. Георгієвський Г. В.; д. хім. н., професор Гризодуб О. І.;
к. фарм. н., ст. наук. співр. Дмитрієва М. В.; к. фарм. н., ст. наук. співр. Зінченко О. А.;
д. хім. н., ст. наук. співр. Куліков А. Ю.; к. б. н., ст. наук. співр. Лібіна В. В.;
 - д. фарм. н., професор Ляпунов М. О.; к. б. н. Нікітіна Н. С.; к. мед. н., ст. наук. співр. Чайка Л. О.
 - Випуск підготували: Саматов Р. С., Боярська В. О., Лук'янова І. С., Лук'янова О. С., Вовк О. Г.
 - Рекомендовано до друку вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 4 від 19.09.2017.
 - Підписано до друку 29.09.17. Тираж 500 прим.

Содержание

К 75-летию со дня рождения Чайки Леонида Александровича	5
<u>Стандартизация лекарственных средств и валидация методик контроля качества</u>	
<i>Андрющенко Т. Л., Верушкин А. Г., Куликов А. Ю., Верушкина О. С.</i>	
Разработка и валидация методики количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол» методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.....	7
<i>Бурмака А. В., Гуреева С. Н., Маргитич В. М.</i>	
Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида.....	17
<i>Зинченко И. А., Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П.</i>	
Валидация аналитической методики количественного определения примесей кетопрофена методом жидкостной хроматографии	25
<i>Ляпунова А. Н., Безуглая Е. П., Шишкина С. В., Баумер В. Н.</i>	
Исследование некоторых физико-химических свойств мометазона фууроата безводного и мометазона фууроата моногидрата	33
<i>Назарова Е. С., Вербова Ю. М., Алмакаева Л. Г., Бегунова Н. В., Доля В. Г.</i>	
Аналитическое обеспечение фармацевтической разработки комбинированного оригинального препарата в форме раствора для инфузий для лечения критических состояний различной этиологии	46
<u>Фармакологические исследования</u>	
<i>Гузъ Н. И., Кобылинская Л. И., Филипская А. М., Лагутина О. С., Дмытруха Н. М., Корытнюк Р. С.</i>	
Определение жизнеспособности клеток во время фармацевтической разработки растворов для перитонеального диализа	54
<i>Кишинец Н. В., Маслова Н. Ф.</i>	
Изучение влияния препарата «Бронхофит», настойка сложная, на структурно-функциональные показатели бронхолегочной системы крыс в условиях экспериментального альвеолита	64
<u>Аналитический обзор</u>	
<i>Меркулова Ю. В.</i>	
Пирогенная реакция и пирогены как составляющая проблемы безопасности парентеральных препаратов	69
<u>К сведению авторов журнала «Фармаком»</u>	
Требования к публикациям.....	78

До 75-річчя з дня народження Чайки Леоніда Олександровича



5 серпня 2017 р. виповнилось 75 років відомому українському фармакологу Чайці Леоніду Олександровичу.

Леонід Олександрович Чайка закінчив Харківський державний медичний інститут у 1965 р., після чого протягом 1965-67 рр. працював лікарем-епідеміологом і лікарем-інфекціоністом центральної районної лікарні (м. Турійськ, Волинська обл.), а у 1967-68 рр. став аспірантом Українського інституту вдосконалення лікарів (м. Харків).

У 1968 р. Леонід Олександрович почав працювати на посаді молодшого наукового співробітника у Харківському науково-дослідному хіміко-фармацевтичному інституті (у подальшому — ВНДІХТАЗ, ДНЦЛЗ). У 1981 р. захистив кандидатську дисертацію під керівництвом проф. Хаджая Я. І. за темою «Фармакологічне дослідження етил-3,5,6-три-О-бензил-Д-глюкофуранозиду» та здобув ступінь кандидата медичних наук за спеціальністю «фармакологія». Далі (з 1982 р.) Л. О. Чайка працював старшим науковим співробітником, а у 1990 р. обійняв посаду завідувача лабораторії загальної фармакології ДНЦЛЗ. У 1991 р. Чайці Леоніду Олександровичу присвоєне вчене звання старшого наукового співробітника. Водночас (з 1993 р.) він є старшим науковим співробітником, а далі — провідним науковим співробітником Фармакопейного комітету МОЗ України (у подальшому — ДП «НЕФЦ», ДП «УНФЦКЯЛЗ»).

Леонід Олександрович Чайка — досвідчений фармаколог і талановитий організатор, який об'єднав навколо себе працездатний колек-

тив висококваліфікованих професіоналів, що мають ґрунтовні теоретичні знання і значний експериментальний досвід у різних напрямках фармакології.

На початку 90-х років, коли Україна відчувала найгостріший дефіцит ліків, а вітчизняна фармацевтична промисловість була у глибокій кризі, лабораторія загальної фармакології, очолювана Л. О. Чайкою, активно включилася у реалізацію державної «Комплексної програми розвитку медичної і мікробіологічної промисловості і поліпшення забезпечення населення лікувальними засобами на 1992-96 рр.». У цей складний період для української фармації та у подальші роки очолювана ним лабораторія за безпосередньої участі Леоніда Олександровича, співпрацюючи з фахівцями технологічних і аналітичних підрозділів ДП «ДНЦЛЗ», розробляє з впровадженням у виробництво:

- Перші вітчизняні моно- і комбіновані анальгетики-антипіретики масового попиту, а за підтримки МОЗ України і «Укрмедбіопрому» на заміну застарілим і вкрай небезпечним фенацетину й амідопірину була створена серія комбінованих препаратів з парацетамолом, що дозволило розпочати масштабне виробництво цієї актуальної групи засобів на провідних заводах України («Дарниця», «Здоров'я», «Галичфарм», «Лубнифарм») і повністю задовольнити у них нагальні потреби сектора охорони здоров'я.
- Оригінальні вітчизняні препарати на основі амінокислот та інших субстанцій у різних лікарських формах — «Ацелізин», «L-Лізину есцинат», «Глутаргін», «Октамін», «Факовіт», «Нуклеїнат кардіоаргінін», «Печаєвський валідол-натур» та інші — деякі з них потім стали відомими українськими брендами, що випускаються низкою фармацевтичних підприємств України: «Київмедпрепарат», «Галичфарм», «Здоров'я», «Технолог», «Біосел».
- Перші на теренах колишнього СРСР препарати групи статинів — симвастатин та ірбесартан. Наразі ведуться дослідження з пошуку нових оригінальних гіполіпемічних засобів фітохімічного походження («Дарниця», «Київський вітамінний завод»).
- Велику групу вітчизняних очних крапель, які випускаються фармацевтичними підприємствами «Фармак», «Дарниця».
- Понад 200 імпортозаміщуючих вітчизняних засобів різних фармакотерапевтичних груп у

твердих, м'яких і рідких лікарських формах на замовлення, переважно, фармацевтичних підприємств України, а також підприємств Росії, Грузії.

Водночас у лабораторії загальної фармакології з середини 80-х років у комплексі з технологічними підрозділами ДНЦЛЗ проводилися масштабні фармакокінетичні дослідження, спрямовані на створення оптимального складу, підвищення ефективності і безпечності твердих і м'яких лікарських форм.

З 1995 р. лабораторія загальної фармакології регулярно атестувалася Державним фармакологічним центром МОЗ України як база для доклінічних досліджень.

Напрямом науково-практичної діяльності Леоніда Олександровича Чайки є фармакологічні дослідження лікарських засобів різної спрямованості дії. Також він є фахівцем у галузі біологічного контролю якості ліків, будучи співавтором кількох відповідних монографій для Державної Фармакопеї України.

Наразі Леонід Олександрович Чайка є автором 326 наукових праць у вітчизняних і закордонних виданнях, зокрема 37 патентів та однієї монографії.

На початку 90-х років Л. О. Чайка працював у групі фахівців, що займалася науково-організаційними питаннями створення першого в незалежній Україні регуляторного органу з експертизи та реєстрації лікарських засобів — Фармакологічного комітету МОЗ України (зараз — ДП «Державний експертний центр МОЗ України»).

Л. О. Чайка є членом вченої ради ДП «ДНЦЛЗ». У різні роки був членом президії Фармакологічного комітету МОЗ України, членом вченої ради ДП «Державний фармакологічний центр». Під керівництвом Л. О. Чайки захищені 5 кандидатських дисертацій з актуальних проблем фармакології.

За значний особистий внесок у розвиток фармацевтичної промисловості, зміцнення структури галузі охорони здоров'я, забезпечення населення якісними медикаментами, відданість справі, успішну наукову діяльність та активну громадську позицію Чайка Л. О. неодноразово заохочувався почесними грамотами і подяками Державного комітету України з медичної промисловості (1996 р.), Харківської обласної Державної адміністрації (2001 р.), Міністра охорони здоров'я України (2000-2002 рр.), президента Об'єднання роботодавців медичної промисловості України (2005 р.), оргкомітету Національного рейтингу учасників фармацевтичного ринку України (2006 р.), Державної служби України з лікарських засобів (2014 р.), заводів галузі та керівництва ДП «ДНЦЛЗ».

Леонід Олександрович Чайка — дуже турботлива людина, він виховав чудових сина та доньку, опікується не тільки родиною, але й усіма співробітниками колективу, який він очолює.

Колектив ДП «ДНЦЛЗ», ДП «Фармакопейний центр» і редакція журналу «Фармаком» щиро вітають Леоніда Олександровича Чайку з ювілеєм та бажають міцного здоров'я, творчої наснаги, довгих років плідної праці.

*Колектив ДП «ДНЦЛЗ»
Колектив ДП «Фармакопейний центр»
Редакція журналу «Фармаком»*

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 543.544.5.068.7+543.8+615.07

Андрющенко Т. Л., Верушкин А. Г., Куликов А. Ю., Верушкина О. С.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»
Санитарно-гигиенический отдел воинской части А4510, г. Харьков

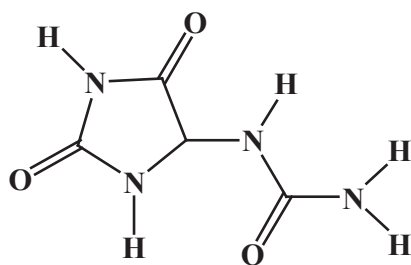
Разработка и валидация методики количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол» методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Разработана экономичная методика для количественной оценки содержания аллантаина в препарате «Йодиксол» с использованием метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Отделение аллантаина от других действующих и вспомогательных компонентов проводили на С18-сорбентах с внедренными полярными группами типа Symmetry Shield, Supelcosil LC-ABZ с использованием фосфатного буферного раствора рН 3.0 в качестве подвижной фазы. Для разработанной методики проведена процедура валидации в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины. Показано, что методика по валидируемым параметрам (специфичность, линейность, диапазон применения, правильность, прецизионность, робастность) удовлетворяет рассчитанным критериям и может быть рекомендована фармпредприятиям для количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол» или его аналоге.

Ключевые слова: аллантаин, «Йодиксол», обращенно-фазовая ВЭЖХ, валидация.

Аллантаин (2,5-диоксо-4-имидазолидинил-мочевина) — гетероциклическое органическое соединение, производное пурина (Рис. 1). Основные химические свойства аллантаина заключаются в вяжущем и противовоспалительном эффекте; он также широко используется для заживления поврежденных тканей — после его нанесения на кожу происходит быстрая регенерация клеток за счет их пролиферации. Это обусловило применение аллантаина в косметических средствах (смягчение и увлажнение кожи, ранозаживляющее действие), а также в клинической практике для лечения медленно заживающих ран, ожогов и повреждений кожи [1-3]. Согласно требованиям документации FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США) [4, 5] допустимое содержание аллантаина в препаратах составляет от 0.1 % до 2.0 %.

Рисунок 1



Структурная формула аллантаина

Количественное определение аллантаина как в косметических средствах, так и в фармацевтических препаратах проводят хроматографическими методами, в основном используя высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ); хотя в литературе описаны и спектрофотометрические методики, и методики кислотно-основного титрования [6].

Можно выделить 3 основных хроматографических метода для определения аллантаина: ВЭЖХ на нормально-фазовых сорбентах (силикагель с привитыми аминными группами), HILIC-хроматография (хроматография гидрофобных взаимодействий) и обращенно-фазовая хроматография (ОФ-ВЭЖХ) с использованием предколоночной дериватизации.

Наиболее распространенным является метод ВЭЖХ на аминофазах [7-9]. При всех преимуществах данной методики, она обладает двумя существенными недостатками: большой расход органического растворителя (ацетонитрила) и малый срок службы хроматографической колонки при анализе аллантаин-содержащих препаратов — привитые аминогруппы образуют основания Шиффа, вследствие чего сорбент теряет свои химические и хроматографические свойства (Рис. 2).

Хроматография гидрофобных взаимодействий в настоящее время широко рекламируется и продвигается разработчиками HILIC-сорбентов для применения в том числе и в фармацевтическом анализе. Опубликован ряд работ [10-13], в которых описано использование

НПИС-сорбентов для количественного определения аллантаина в косметических средствах. К сожалению, использование подвижных фаз с большим содержанием органического модификатора (70-90 %) делает данный метод дорогостоящим при его использовании в рутинном анализе.

Высокая гидрофильность аллантаина ($\text{ClogP} = -2.34$) затрудняет использование обращенно-фазовой ВЭЖХ для его количественного определения. Поэтому для его определения либо используют производные аллантаина, например, с 2,4-динитрофенилгидразоном [14, 15], либо применяют введение в состав подвижной фазы ион-парных реагентов для увеличения его удерживания [16, 17].

Использование хроматографических методов для количественного определения аллантаина в готовых лекарственных средствах дает возможность его быстрого (экспрессность) и точного определения с минимальными затратами (экономичность) и минимальным влиянием других компонентов лекарственного средства [18]. В утвержденном аналитическом норма-

тивном документе (АНД) на препарат «Йодиксол» количественное определение аллантаина проводят методом ВЭЖХ с использованием хроматографического сорбента с привитыми аминогруппами. Такая методика оказалась не вполне приемлемой для поточного анализа (Рис. 2), так как при длительном использовании колонки начинает изменяться форма хроматографического пика, что отрицательно влияет на количественную оценку содержания аллантаина в препарате и в конечном итоге делает ее невозможной.

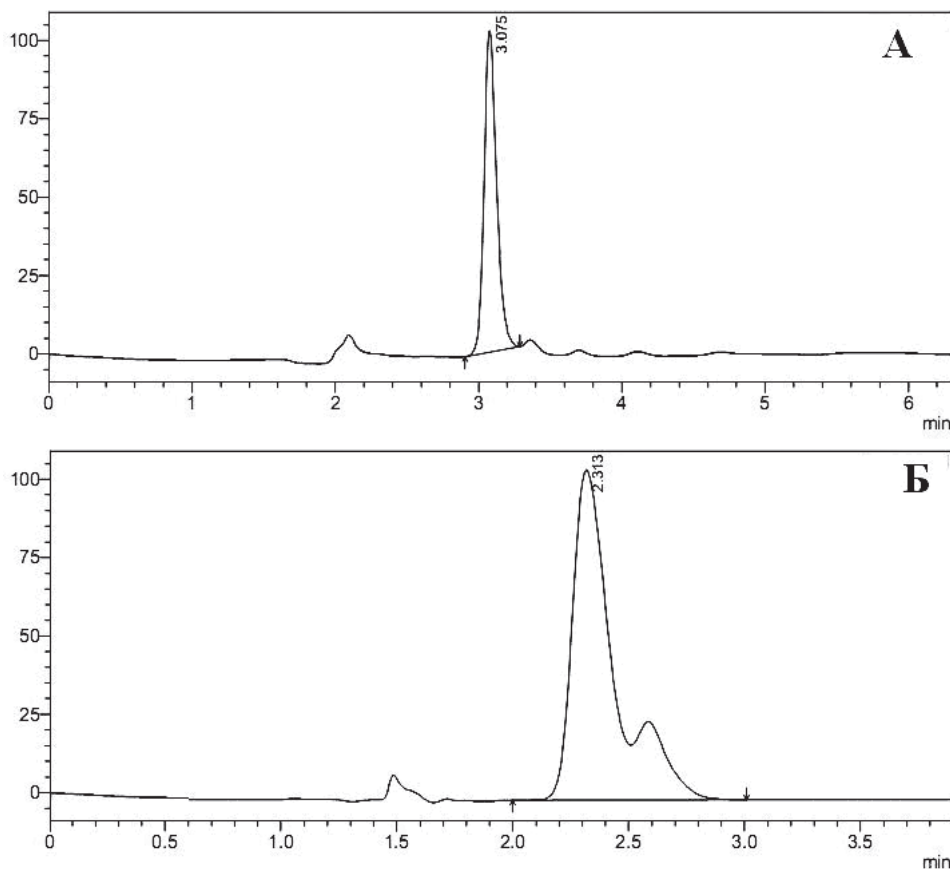
Поэтому целью данной работы была разработка и валидация хроматографической методики для количественной оценки содержания аллантаина в препарате «Йодиксол», которая позволяла бы проводить длительный поточный хроматографический анализ готового лекарственного средства.

Экспериментальная часть

Реактивы и растворы

Субстанция аллантаина с содержанием основного вещества 99.9 % была предоставлена

Рисунок 2



ВЭЖХ-хроматограммы определения аллантаина в препарате «Йодиксол» на новой колонке (аминофаза) (А) и после 3 месяцев поточных анализов препарата (Б)

ООО «Микрофарм» и использовалась в качестве стандартного образца аллантаина. Лития дигидрофосфат, этанол 96 %, пропиленгликоль, фосфат натрия додекагидрат, кислота лимонная безводная, кислота фосфорная концентрированная — производства Sigma-Aldrich. Субстанция повидон-йод с содержанием йода 11.7 % (производство Ashland, США) также была любезно предоставлена ООО «Микрофарм». Реактивы и субстанции соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ).

Препарат «Йодиксол» различных серий производства был предоставлен ООО «Микрофарм».

Оборудование

Хроматографические измерения были проведены на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 (Shimadzu Corp, Duisburg, Germany). Хроматографические колонки: Symmetry Shield RP18 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм, Waters Corp, Milford, USA) и Supelcosil LC-ABZ (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Разделение проводили при температуре $(30.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$; скорость подвижной фазы составляла 1.0 мл/мин; объем вводимой пробы — 10 мкл; длина волны детектирования — 220 нм.

Значение pH подвижных фаз контролировалось с помощью pH-метра Beckman Ф-200 pH meter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Обработку хроматограмм проводили с использованием программы LCSolution (Shimadzu Corp, Duisburg, Germany).

Приготовление растворов

Стандартный раствор аллантаина готовили следующим образом: 0.0265 г стандартного образца аллантаина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 10 мл 96 % этанола, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Срок годности раствора при его хранении в темном прохладном месте — 14 сут.

Рабочие растворы аллантаина готовили разбавлением стандартного раствора подвижной фазой до получения необходимой концентрации. Растворы использовали свежеприготовленными.

Раствор плацебо готовили следующим образом: навески повидон-йода, этанола 96 %, пропиленгликоля и других вспомогательных компонентов (согласно прописи готового лекарственного средства) помещали в емкость

вместимостью 100 мл и получали 60 г раствора плацебо «Йодиксола». Раствор плацебо хранили в плотно закупоренной таре в защищенном от света месте при температуре около 10°C и использовали в течение 7 сут.

Модельную смесь препарата готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2.0 мл стандартного раствора аллантаина, 1.00 г раствора плацебо «Йодиксола», доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Испытуемый раствор препарата готовили следующим образом: 1.00 г (точная навеска) препарата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Результаты и обсуждение

Выбор состава подвижной фазы и хроматографических условий

Высокая гидрофильность аллантаина делает затруднительным его количественное определение с использованием метода ОФ-ВЭЖХ, так как его удерживание на сорбентах с привитыми С18-группами достаточно слабое. В настоящее время для анализа соединений высокой гидрофильности все чаще используют специфические сорбенты с включенными полярными группами [19] — сорбенты с полярным эндкеппингом или с внедренными полярными группами. Особенность таких сорбентов заключается в том, что внедренные полярные группы создают вокруг сорбента «электростатический щит», который в значительной степени меняет селективность С18 сорбентов в сторону увеличения удерживания гидрофильных соединений.

Работа на таких фазах требует использования подвижных фаз с низким содержанием органического модификатора или даже вообще без него. Так, адениновые нуклеотиды на таких сорбентах разделяются с использованием фосфатных буферных растворов с различной величиной pH [19].

Аллантаин является неким «структурным аналогом» адениновых нуклеотидов, и поэтому было решено использовать фосфатный буферный раствор в качестве начального приближения для удерживания аллантаина и отделения его от вспомогательных веществ препарата.

Были проведены исследования по влиянию катиона (натрий, калий, литий, аммоний) фосфатного буферного раствора и величины его pH (от 2.0 до 5.0, с шагом 0.5 единицы pH) на

удерживание и асимметрию пика аллантаина и на его способность отделяться от вспомогательных вещества препарата «Йодиксол». Было отмечено, что использование фосфата аммония как компонента буферного раствора значительно уменьшает удерживание аллантаина, сдвигая его к мертвому времени колонки. Поэтому от использования данного компонента отказались.

Замена других катионов практически не оказывает влияния на удерживание и форму хроматографического пика, в отличие от pH. Отмечалось, что в кислых средах наблюдается более приемлемое удерживание и асимметрия пика аллантаина. Поэтому на основании проведенных предварительных исследований и с целью увеличения срока службы колонки было решено использовать в качестве подвижной фазы буферный раствор на основе фосфата лития с pH 3.0. С выбранной подвижной фазой была разработана методика количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол» и проведена ее валидация.

Методика количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол»

Испытуемый раствор: около 1.00 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения: около 0.025 г (точная навеска) стандартного образца аллантаина (EP SCR или ФСО ГФУ) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл 96 % этанола, доводят объем раствора 96% этанолом до метки и перемешивают. Срок годности раствора — 14 сут. 2.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

По 10 мкл раствора сравнения и испытуемого раствора хроматографируют на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором в следующих условиях:

- хроматографическая колонка Symmetry Shield RP18 или Supelcosil LC-ABZ размером 150 мм × 4.6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: 0.01 М раствор дигидрофосфата лития, доведенный до pH 3.0 кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически);
- температура термостата колонки — 30 °С;
- скорость подвижной фазы — 1.0 мл/мин;

— длина волны детектирования — 220 нм.

Содержание аллантаина (X) в 1 г препарата, в миллиграммах, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_i \times m_0 \times 2 \times 25 \times P \times 1000}{S_0 \times 50 \times 25 \times m \times 100} = \frac{S_i \times m_0 \times P \times 0.4}{S_0 \times m},$$

где S_i — средняя площадь пика аллантаина, рассчитанная из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 — средняя площадь пика аллантаина, рассчитанная из хроматограмм раствора сравнения;

m_0 — масса навески стандартного образца аллантаина, в граммах;

m — масса навески препарата, в граммах;

P — содержание основного вещества в стандартном образце аллантаина, в процентах.

Содержание аллантаина в 1 г препарата должно быть от 0.90 мг до 1.10 мг.

Результаты считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- коэффициент симметрии пика аллантаина должен быть не более 1.5;
- эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику аллантаина из хроматограмм испытуемого раствора и раствора сравнения, должна быть не менее 1600 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площадей пиков аллантаина, рассчитанное по пику аллантаина из хроматограмм испытуемого раствора и раствора сравнения, должно соответствовать требованиям ГФУ, 2.2.46.

Валидация методики количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол»

Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями ГФУ [20] и Руководства СРМР/ICH/381/95.

Для метода количественного определения валидация проводится по следующим характеристикам: специфичность, правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения. Также должна быть рассчитана полная неопределенность методики количественного определения аллантаина.

Содержание аллантаина в 1 г препарата должно быть от 0.90 мг до 1.10 мг (номинальное содержание — 1 мг/г препарата), то есть $\pm 10\%$ от номинального содержания ($B = 10$). Следовательно, максимально допустимая неопреде-

ленность результатов количественного определения аллантаина должна составлять:

$$\Delta_{As} \leq B \times 0.32 = 10 \times 0.32 = 3.2 \%$$

Неопределенность пробоподготовки должна быть незначимой по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа [ГФУ]:

$$\Delta_{Sp} < \Delta_{As} \times 0.32 = 3.2 \times 0.32 = 1.024 \%$$

Специфичность методики

Критерии приемлемости для характеристики «Специфичность» следующие: 1) на хроматограмме раствора плацебо должны отсутствовать пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика аллантаина, и 2) время удерживания пика аллантаина на хроматограммах испытуемого раствора должно совпадать со временем удерживания пика аллантаина на хроматограммах раствора сравнения с точностью, не превышающей статистически значимую разницу между временами удерживания.

На Рис. 3 приведены хроматограммы, полученные при изучении специфичности методики.

Как видно из Рис. 3, в области выхода пика аллантаина (около 3.25 мин) на хроматограмме

раствора плацебо (Рис. 3Б) не наблюдается дополнительных пиков, и, следовательно, первый критерий выполняется. Выполнение второго критерия наглядно демонстрируют хроматограммы, приведенные на Рис. 3А (раствор стандартного образца аллантаина) и Рис. 3В (испытуемый раствор препарата); времена выхода пика аллантаина на обоих приведенных хроматограммах различаются незначимо.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что методика определения аллантаина в препарате «Йодиксол» методом ВЭЖХ является специфичной.

Линейность методики

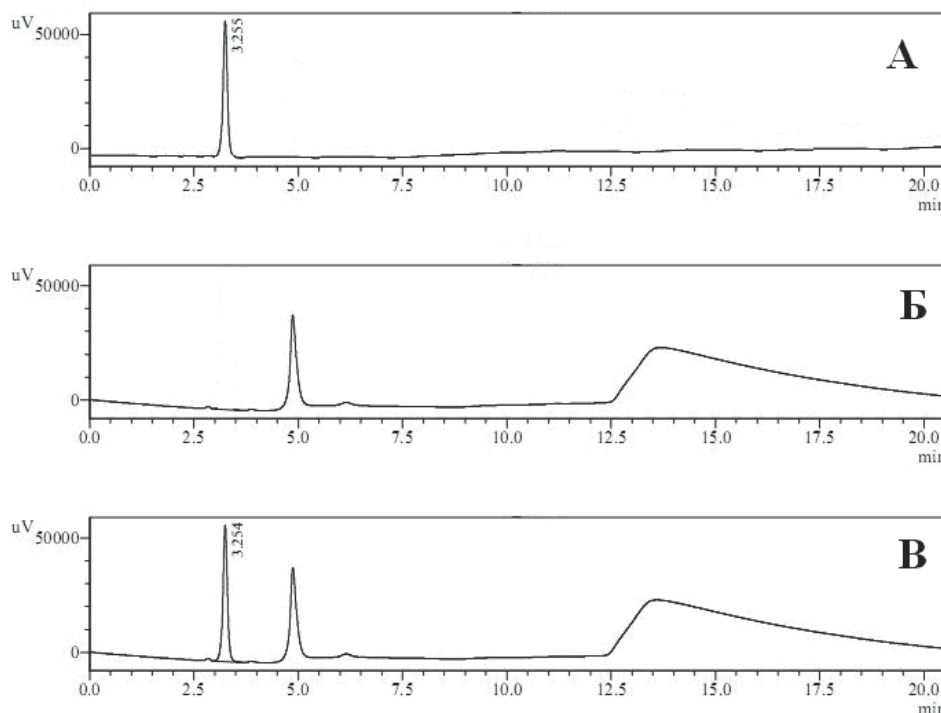
Зависимость между введенным (C_i/C_{st}) и найденным (S_i/S_{st}) количеством определяемого вещества в области действия методики должна быть линейной (в нормализованной системе координат), и быть представленной уравнением вида $(S_i/S_{st}) \times 100 = b \times (C_i/C_{st}) \times 100 + a$.

Для характеристики «Линейность» должны выполняться следующие условия:

1) Свободный член (a) должен быть статистически неотличим от нуля.

Критерий статистической незначимости параметра a не должен превышать свой довери-

Рисунок 3



Хроматограммы стандартного раствора аллантаина (А), раствора плацебо (Б) и испытуемого раствора препарата (В), полученные в предлагаемых условиях хроматографирования

тельный интервал, а именно (для 11 растворов и 3 параллельных определений):

$$a \leq \Delta_a = t(95\%, n - 2) \times S_a = 1.6973 \times S_a.$$

Критерий практической незначимости рассчитывают в случае, если не выполняется критерий статистической незначимости, по формуле ($B = 10\%$ и $X_{min} = 75\%$):

$$a \leq \frac{0.32 \times \Delta_{As} (\%) }{1 - (X_{min} / 100)} = \frac{0.32 \times 3.2}{1 - (75 / 100)} = 4.096.$$

2) Относительное остаточное стандартное отклонение (RSD_0 — отношение остаточного стандартного отклонения RSD_{rest} к тангенсу угла наклона регрессионной прямой b) не должно превышать:

$$RSD_0 = RSD_{rest} / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)} = \frac{3.2}{1.6973} = 1.885\%.$$

3) Коэффициент корреляции (r), рассчитанный с использованием величины $RSD_Y = 16.583\%$, должен превышать величину

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_0}{RSD_Y}\right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{1.885}{16.583}\right)^2} = 0.99352.$$

Линейность исследовали в диапазоне концентраций аллантаина от 75 % до 125 % по отношению к номинальному значению; измерения проводили для 11 растворов с шагом 5 % в

3 параллельных определениях. График линейной зависимости найденного количества аллантаина от введенного представлен на Рис. 4, а результаты расчета параметров линейной зависимости и соответствие их рассчитанным критериям — в Табл. 1.

Как видно из данных, приведенных на Рис. 4 и в Табл. 1, предлагаемая методика удовлетворяет всем рассчитанным критериям; методика линейна в изучаемом диапазоне концентраций аллантаина — от 75 % до 125 % по отношению к номинальному содержанию аллантаина.

Прецизионность (сходимость) и правильность методики

Для оценки сходимости используют относительный доверительный интервал, который должен быть меньше максимально допустимой неопределенности результатов анализа: $\Delta_{As} \leq 3.2\%$ (при $B = 10\%$).

Для оценки правильности определяется степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной методике, то есть методика не должна иметь значимой систематической погрешности: $\Delta = |\bar{Z} - 100|$ должна незначимо отличаться от нуля.

Для характеристики «правильность» должны выполняться следующие условия:

1) Критерий статистической незначимости (для 33 точек измерения): $\Delta\% \leq \Delta_{As} / \sqrt{n} = 3.2 / 5.74 = 0.557$.

2) Критерий практической незначимости: $\Delta\% \leq 0.32 \times 3.2 = 1.024\%$.

Рисунок 4

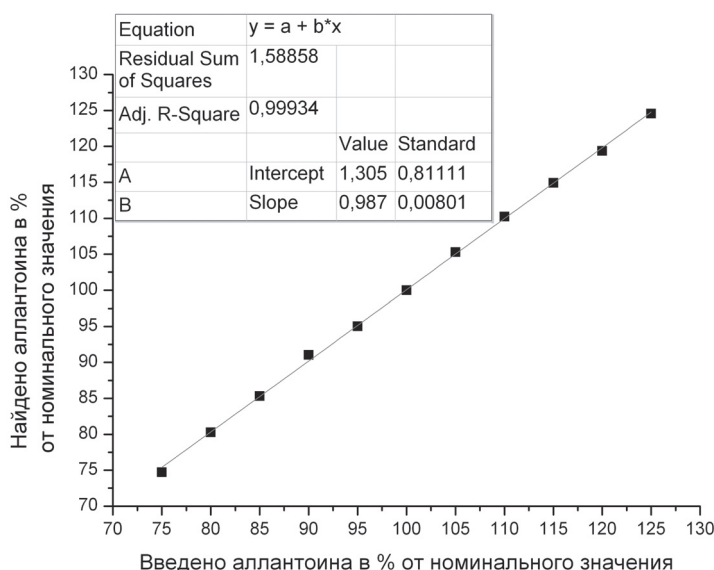


График линейной зависимости найденного количества аллантаина от введенного

Диапазон применения методики для количественного определения — от 75 % до 125 % от номинального содержания аллантаина в препарате.

Характеристики исследовали на модельных растворах в диапазоне от 75 % до 125 % (шаг 5 %) от номинального содержания аллантаина в препарате. Модельные растворы готовили с использованием раствора плацебо препарата.

Правильность и прецизионность методики были проверены методом «введено/найдено». Результаты количественного определения каждого из компонентов в модельных растворах в

исследуемой области концентраций и расчет метрологических характеристик приведены в Табл. 2.

Из данных, приведенных в Табл. 2, следует, что методика количественного определения аллантаина характеризуется достаточной правильностью и прецизионностью (сходимостью) во всем диапазоне концентраций (от 75 % до 125 %), так как полученные значения доверительного интервала и систематической погрешности не превышают рассчитанных критических величин. Методика является корректной

Таблица 1

Характеристики линейной зависимости найденной концентрации аллантаина от введенной

Параметры	Значения	Критерии приемлемости		Заключение
<i>b</i>	0.9877			
<i>S_b</i>	0.0080			
<i>a</i>	1.3054	≤ 1.3767	≤ 4.096	Выдерживается по обоим критериям
<i>S_a</i>	0.8111			
<i>RSD₀</i>	1.5886			
<i>RSD₀/b</i>	1.6084	≤ 1.885		Выполняются
<i>r</i>	0.99967	≥ 0.99352		Выполняются

Таблица 2

Результаты анализа модельных смесей препарата и их статистическая обработка

№ р-ра	Концентрация аллантаина в мг/мл	Введено в % от номинальной концентрации (<i>X_i</i> , факт., %)	Средняя площадь пика	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (<i>Y_i</i> , %)	Найдено в % к введенному, <i>Z_i</i> = 100 × (<i>Y_i</i> / <i>X_i</i>)
1	0.0318	75.00	333787.6	74.33	99.11
2	0.0339	80.00	358528.3	79.94	99.92
3	0.0360	85.00	381210.3	85.08	100.09
4	0.0382	90.00	406733.3	90.86	100.96
5	0.0403	95.00	424539.3	94.90	99.89
6	0.0424	100.00	446719.8	99.92	99.92
7	0.0445	105.00	470294.3	105.27	100.25
8	0.0466	110.00	492501.3	110.30	100.27
9	0.0488	115.00	513467.7	115.05	100.05
10	0.0509	120.00	533284.7	119.54	99.62
11	0.0530	125.00	556513.2	124.81	99.85
Среднее, \bar{Z} , % =					99.99
Относительное стандартное отклонение, <i>RSD_z</i> , % =					0.45
Относительный доверительный интервал Δ_z % = $t(95\%, n - 2) \times RSD_z = 1.6973 \times 0.45 =$					0.77
Критическое значение для сходимости результатов $\delta_{\text{дст}}$ % =					3.2
Систематическая ошибка δ % =					0.01
Критерий статистической незначимости $\delta \leq$					0.557
Критерий практической незначимости $\delta \leq$					1.024

и не имеет практически значимой систематической ошибки.

Прогнозирование полной неопределенности методики

Для подтверждения корректности методики при ее воспроизведении в других лабораториях была рассчитана полная неопределенность методики (Δ_{As}^{calc}), которая включает в себя неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}).

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

Рассчитанная полная неопределенность методики не должна превышать максимально допустимую неопределенности результатов анализа: $\Delta_{As} \leq 3.2\%$ (при $B = 10\%$).

В Табл. 3 приведены данные и расчет полной неопределенности методики.

Таким образом, полная прогнозируемая неопределенность результатов при количественном определении аллантаина не превышает критиче-

ское значение 3.2 %, и, следовательно, при воспроизведении в других лабораториях методика будет давать корректные результаты.

Робастность методики

Для подтверждения работоспособности методики была проверена ее робастность, то есть влияние небольших изменений в условиях хроматографирования на результаты определения аллантаина.

Проведенные исследования показали, что изменения скорости подвижной фазы ($\pm 10\%$), температуры колонки ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$), длины волны детектирования ($\pm 2\text{ нм}$) и pH подвижной фазы (± 0.1 единица pH) не оказывают заметного влияния на результаты количественной оценки содержания аллантаина в препарате «Йодиксол».

Наиболее сильное изменение при проведении количественного определения аллантаина было отмечено при замене колонки Symmetry Shield RP18 на аналогичную ей колонку Supelcosil LC-ABZ (оба сорбента относятся к группе «сорбент на основе силикагеля

Таблица 3

Расчет неопределенности методики количественного определения аллантаина

Расчет неопределенности пробоподготовки			
Раствор сравнения		Испытуемый раствор	
Аналитическая операция	Неопределенность, %	Аналитическая операция	Неопределенность, %
Взятие навески СО аллантаина (25 мг)	0.80	Взятие навески СО аллантаина (1000 мг)	0.02
Доведение до объема в мерной колбе 50 мл	0.17	Доведение до объема в мерной колбе 25 мл	0.23
Аликвота 2.0 мл	0.50		
Доведение до объема в мерной колбе 25 мл	0.23		
Неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP} = 1.012 \leq \Delta_{SPmax} = 1.024$.			
Расчет неопределенности конечной аналитической операции			
	Раствор сравнения	Испытуемый раствор	
Площадь хроматографического пика	447096	447592	
	447741	447846	
	446953	448728	
	447128	447821	
	447348	447955	
Среднее значение	447253	447988	
RSD _i , %	0.069	0.097	
$\Delta_{FAO}^i = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD_i$	0.062	0.087	
Неопределенности конечной аналитической операции $\Delta_{FAO} = 0.107\%$.			
Полная неопределенность методики $\Delta_{As}^{calc} = 1.018\% \leq \Delta_{As} = 3.2\%$.			

с привитыми полярными группами»). На Рис. 5 приведены хроматограммы раствора плацебо препарата «Йодиксол», раствора стандартного образца и испытуемого раствора препарата, полученные на колонке Supelcosil LC-ABZ. Можно отметить, что хроматографическое поведение аллантаина практически одинаково на обеих колонках, в то время как удерживание остальных компонентов препарата «Йодиксол» достаточно заметно отличается (Рис. 2 и 5).

Сравнение результатов количественного определения модельных смесей препарата «Йодиксол», полученных на колонках Symmetry Shield RP18 и Supelcosil LC-ABZ, с использованием F-критерия показало, что результаты различаются незначимо, и, следовательно, вышеуказанные колонки являются взаимозаменяемыми.

Выводы

1. Разработана экспрессная и экономичная методика количественного определения аллантаина в препарате «Йодиксол». Для разработанной методики была проведена процедура валидации в соответствии с требованиями фармакопеи Украины.

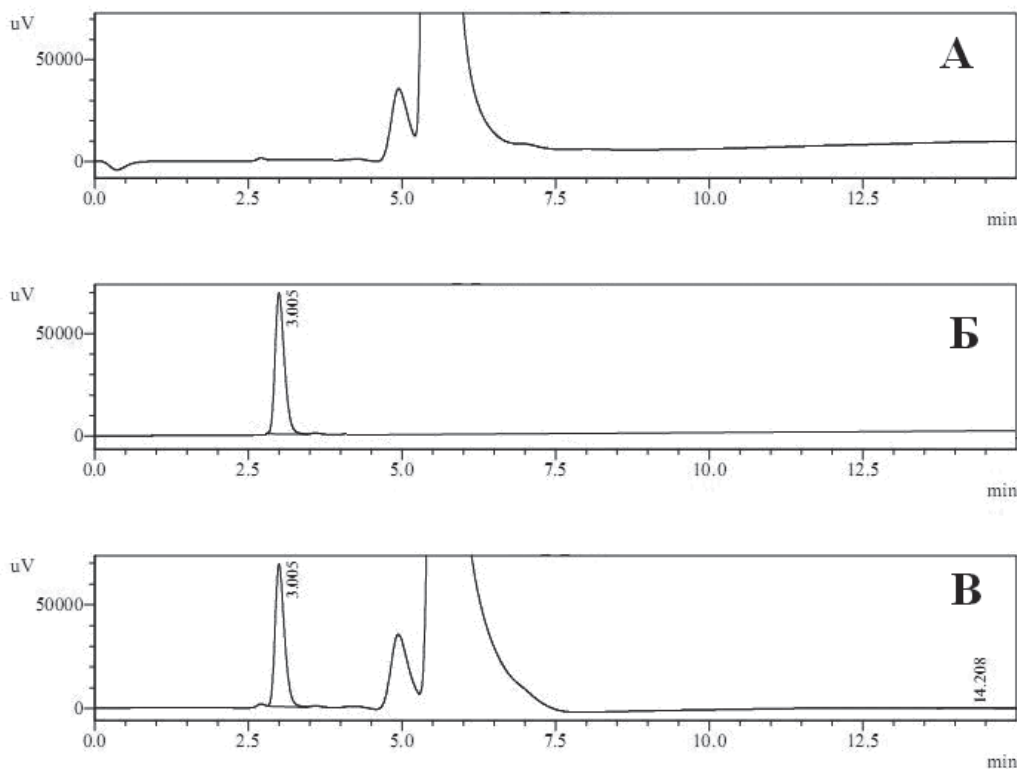
2. Показано, что по изучаемым валидационным характеристикам (специфичность, правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения, робастность) разработанная методика удовлетворяет требованиям, описанным в ГФУ.

3. Рассчитана полная неопределенность методики количественного определения аллантаина для оценки возможности воспроизведения методики в других лабораториях и получения корректных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes / C.L. Burnett, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, C.D. Klaassen et al. // International Journal of Toxicology. — 2010. — Vol. 29. — № 3_suppl. — P. 84S-97S.
2. Posner A.M. Allantoin — its properties and uses // Journal of Cosmetic Science. — 1958. — Vol. 9. — № 1. — P. 58-61.
3. Szymanska E. Allantoin — healing and anti-inflammatory properties // Pediatria i Medycyna Rodzinna. — 2012. — Vol. 8. — № 1. — P. 73-77.
4. Federal Register (1983). Staff Congressional Information Service Inc. National Archives and Records Administration, Office of the Federal Register, USA. 48, 32, 6820-6833.
5. Federal Register (1990). Staff Congressional Information Service Inc. National Archives and Records Administration, Office of the Federal Register, USA. 55, 11, 25240-25281.
6. Chen X.B. Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceutical samples / Chen X.B., Matuszewski W.,

Рисунок 5



Хроматограммы раствора плацебо (А), стандартного раствора аллантаина (Б) и испытуемого раствора препарата (В), полученные в предлагаемых условиях хроматографирования (изучение робастности методики) на колонке Supelcosil LC-ABZ

- Kovalczyk J. // J AOAC Int. — 1996. — Vol. 79. — N 3. — P. 628-635.
7. Quantitative determination of an extremely polar compound allantoin in human urine by LC-MS/MS based on the separation on a polymeric amino column / A. Berthemy, J. Newton, D. Wu, D. Buhrman // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1999. — Vol. 19. — P. 429-434.
8. Zaidi Z.R. Stability assay of allantoin in lotions and creams by high-pressure liquid chromatography / Zaidi Z.R., Sena F.J., Basilio C.P. // J. Pharm. Sci. — 1982. — Vol. 71. — № 9. — P. 997-999.
9. Trivedi R.J. Stability-Indicating Liquid Chromatographic Procedure for Determination of Allantoin in Cosmetic Lotion // J. AOAC Int. — 1988. — Vol. 71. — № 2. — P. 290-294.
10. Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography / Takahiro Doi, Keiji Kajimura, Satoshi Takatori et al. // J. Chromatogr. B. — 2009. — Vol. 877. — Iss. 10. — P. 1005-1010.
11. Determination of urea and allantoin in cosmetics / Rohrer J.S., Chen Jing, Xu Qun, Li Lang // LCGC. — 2008. — Jun Application Notebook. — <http://www.chromatographyonline.com>.
12. Automated Solid Phase Extraction of Allantoin from Cosmetics and Topical Pharmaceuticals Prior to Analysis by HPLC // Gilson Application Note. — <http://www.gilson.com/UserFiles/file/Allantoin%20SPE%20Note%20PHA0110%20DEC%202010.pdf>.
13. Determination of Urea, Allantoin and Lysine Pyroglutamate in Cosmetic Samples by Hydrophilic Interaction Chromatography / Dallet P., Labat L., Kummer E., Dubost J.P. // J. Chromatogr. B. — 2000. — Vol. 742. — № 2. — P. 447-452.
14. Chen X.B. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization / Chen X.B., Kyle D.J., Orskov E.R. // J. Chromatogr. B. — 1993. — Vol. 617. — № 2. — P. 241-247.
15. Czauderna M., Kowalczyk J. Determination of allantoin in blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization // J. Animal Feed Sci. — 1995. — Vol 4. — P. 351-358.
16. Simultaneous determination of chondroitin sulfate sodium, allantoin and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical eye drops by an ion-pair high-performance liquid chromatography / Pengfei Jin, Jie Ma, Xuejun Wu, Ding Zou et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2009. — Vol. 50. — P. 293-297.
17. A rapid determination of allantoin by high-performance liquid chromatography using tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl buffer as a mobile phase / Yamamoto R., Seki M., Ouchi K., Koyano S. et al. // Yakugaku Zasshi. — 1998. — Vol. 118. — № 8. — P. 310-316.
18. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 томах на русском языке / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2011. — Т. 1. — 464 с. — Т. 2. — 474 с. — Т. 3. — 520 с.
19. Куликов А.Ю. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография / Куликов А.Ю., Верушкин А.Г., Георгиевский В.П. // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 томах на русском языке / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2011. — Т. 2. — С. 637-723.
20. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.
- УДК 543.544.5.068.7 + 543.8 + 615.07
Резюме
Андрющенко Т. Л., Верушкин О. Г., Куликов А. Ю., Верушкіна О. С.
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»
Санітарно-гігієнічний відділ військової частини А4510, м. Харків
- Розробка та валідація методики кількісного визначення алантоїну в препараті «Йодиксол» методом обернено-фазової ВЕРХ**
- Розроблено економічну методику для кількісної оцінки вмісту алантоїну в препараті «Йодиксол» з використанням методу обернено-фазової ВЕРХ. Відділення алантоїну від інших діючих та допоміжних речовин проводили з використанням С18-сорбентів з інкорпорованими полярними групами, таких як Symmetry Shield, Supelcosil LC-ABZ, з використанням фосфатного буферного розчину рН 3.0 як рухомої фази. Для розробленої методики проведено процедуру валідації відповідно до вимог Державної Фармакопеї України. Доведено, що методика за параметрами, що валідуються (специфічність, лінійність, межа застосування, правильність, прецизійність, робастність), відповідає розрахованим критеріям та може бути рекомендована фармацевтичним підприємствам для кількісного визначення алантоїну в препараті «Йодиксол» або його аналогу.
- Ключові слова:* алантоїн, «Йодиксол», обернено-фазова ВЕРХ, валідація.
- UDC 543.544.5.068.7 + 543.8 + 615.07
Summary
Andrjushenko T. L., Verushkin O. G., Kulikov A. Yu., Verushkina O. S.
State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines», Ukraine
Sanitary and hygienic division of military station A4510, Kharkiv, Ukraine
- Development and validation of allantoin assay method in pharmaceutical drug «Iodiksol» using reversed-phased HPLC**
- The economic method for allantoin assay in pharmaceutical drug «Iodiksol» with using reversed-phase HPLC was developed and validated. Allantoin separation from other active ingredients (ethanol, povidone-iodine, menthol) and additives was done with using C18-sorbents with polar-embedded groups such as Symmetry Shield, Supelcosil LC-ABZ; lithium phosphate buffer solution pH 3.0 was used as mobile phase. At mobile phase flow-rate 1.0 ml/min the allantoin retention time was about 3.3 min, and total analysis time was near 15 min, depends on the used chromatographic column. The validation procedure according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine was carried out for the development method. It was demonstrated, that the proposed method according to the validation parameters (specificity, linearity, range, precision, accuracy) was satisfied to the calculated criterion. Proposed method is characterized good chromatographic stability and can be recommended to the drug manufacturers for the allantoin assay in medicinal drug «Iodiksol» or its analogue during routine analysis.
- Keywords:* allantoin, Iodiksol, reversed-phase HPLC, validation.
- Андрющенко Татяна Леонидовна.** Окончила Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (1998). Зам. заведующего лабораторией фармакопейного анализа ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», ст. науч. сотр.

Верушкин Алексей Геннадиевич. Окончил Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (1993). Ст. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Куликов Артем Юрьевич. Окончил Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (1993). Ст. науч. сотр. лаборатории фармако-

пейного анализа ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». Д. х. н. (2014).

Верушкина Оксана Святославовна. Окончила Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (1994). Врач-лаборант высшей категории санитарно-гигиенического отдела воинской части А4510.

УДК 543.612:543.544.5.068.7:615.238

Бурмака А. В., Гуреева С. Н., Маргитич В. М.
ПАО «Фармак», г. Киев

Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида

Разработана методика контроля примесей субстанции энисамиума йодида с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Состав подвижной фазы, скорость ее потока, тип хроматографической колонки подобраны таким образом, что позволяют определять примеси в единых хроматографических условиях. Выбраны длины волн, оптимальные для детектирования примесей. Также подобрана концентрация испытуемого раствора. Успешно выбран ион-парный реагент, обеспечивающий достаточное время удерживания пиков примесей, а также пиков основного компонента.

В результате проведения стрессовых исследований, при которых субстанцию подвергали действию повышенной температуры, окислению, кислотному и щелочному гидролизу, а также влиянию света, подтверждено, что методика является специфической по отношению к определению продуктов деградации субстанции энисамиума йодида.

Допустимые пределы содержания примесей для субстанции энисамиума йодида установлены в соответствии с рекомендациями Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека (ICH).

Ключевые слова: энисамиума йодид, субстанция, ICH Q3A, сопутствующие примеси, ВЭЖХ.

Введение

В связи с необходимостью повышения эффективности и безопасности лекарственных средств повышаются требования к их качеству. Так, например, в рекомендациях ICH Q3A [1] представлена информация относительно подходов к расчету допустимого содержания примесей в активных фармацевтических ингредиентах (АФИ).

Препараты на основе энисамиума йодида являются одними из широко используемых лекарственных препаратов при ОРВИ [2-4].

В научной литературе не описаны методики контроля, позволяющие выполнять контроль примесей энисамиума йодида на рекомендуемом ICH уровне. Существует метод тонкослойной хроматографии для определения сопутствующих примесей, но чувствительность метода недостаточна для обеспечения контроля примесей на уровне не более 0.05 %.

Целью данной работы является разработка методики контроля сопутствующих примесей энисамиума йодида: бензиламина, изоникотиновой кислоты, бензиламида изоникотиновой кислоты и других неизвестных примесей.

В данной работе впервые представлены результаты разработки ВЭЖХ-методики контроля примесей АФИ энисамиума йодида.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) был выбран в связи с необходимостью достижения высокой чувствительности и селективности анализа, так как предел содержания примесей установлен на уровне «не более 0.05 % каждой индивидуальной примеси».

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовали субстанцию энисамиума йодида с. 10415 производства ПАО «Фармак».

При разработке методики были задействованы следующие приборы: жидкостный хроматограф производства Agilent Technologies серии 1260, весы электронные Mettler Toledo AB54S (Швейцария), спектрофотометр Specord 250 Plus (Германия). Также была использована мерная посуда класса А фирмы Simax (Чехия).

В процессе приготовления проб и подвижной фазы использовали следующие реактивы и стандарты: натрия октан-1-сульфоната моногидрат Sigma-Aldrich, кат. № 74882; динатрия гидрогенфосфат безводный Sigma-Aldrich, кат. № 04276; ацетонитрил Sigma-Aldrich, кат. № 34851; фосфорная кислота 85% Sigma-Aldrich, кат. № 04107; натрия гидроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203; вода очищенная, полученная на установке Milli Q

производства Millipore Corporation (Германия); бензиламин Sigma-Aldrich, кат. № 185701; изоникотиновая кислота Sigma-Aldrich, кат. № I17508; стандартный образец энисамиума йодида производства ПАО «Фармак» с. 07-16; стандартный образец бензиламида изоникотиновой кислоты производства ПАО «Фармак» с. 10413. Для проведения стрессовых испытаний использовали раствор перекиси водорода Sigma-Aldrich, кат. № 216763, хлористоводородную кислоту Merck, кат. № 1.00317, натрия гидроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203. Для изучения влияния света на субстанцию в рамках подтверждения селективности методики использовали камеру изучения фотостабильности производства Binder, Германия.

Результаты исследований и их обсуждение

На начальном этапе разработки аналитической методики необходимо было установить перечень потенциальных примесей, а затем рассчитать допустимые пределы в соответствии с международными требованиями, и, исходя из необходимой чувствительности определения примесей, разработать аналитическую методику.

При оценке возможных примесей во внимание была принята схема синтеза субстанции, где в качестве исходных материалов используют изоникотиновую кислоту и бензиламин, а промежуточным продуктом реакции является бензиламид изоникотиновой кислоты [5].

Структурные формулы энисамиума йодида и трех известных примесей представлены на Рис. 1.

Международным документом по установлению пределов содержания сопутствующих примесей в АФИ являются рекомендации ИСН Q3А.

Рисунок 1



Структурные формулы энисамиума йодида и известных примесей субстанции

В соответствии с рекомендациями ИСН Q3А при расчете допустимого содержания идентифицированных и неидентифицированных примесей пользуются данными, представленными в Табл. 1.

Таким образом, для установления пределов содержания примесей необходимо руководствоваться максимальной суточной дозой АФИ.

Согласно инструкции по применению готовой лекарственной формы препарата энисамиума йодида («Амизон Макс», капсулы 0.5 г) [6]

Таблица 1

Рекомендации ИСН Q3А относительно допустимых пределов содержания примесей в АФИ

Максимальная суточная доза АФИ	Порог информирования	Порог идентификации	Порог квалификации
≤ 2 г/сутки	0.05 %	0.10 % или 1.0 мг/сутки (в зависимости от того, что меньше)	0.15 % или 1.0 мг/сутки (в зависимости от того, что меньше)
> 2 г/сутки	0.03 %	0.05 %	0.05 %

Таблица 2

Нормирование содержания примесей в субстанции энисамиума йодида согласно рекомендациям ИСН Q3А

Наименование примеси	Допустимое содержание
Бензиламин	Не более 0.05 %
Изоникотиновая кислота	Не более 0.05 %
Бензиламид изоникотиновой кислоты	Не более 0.05 %
Любая неидентифицированная примесь	Не более 0.05 %

максимальная суточная доза АФИ для пациента составляет 2.0 г. Поэтому, согласно международным рекомендациям, нормирование содержания примесей должно быть на числовых уровнях, представленных в Табл. 2.

В данном случае порог информирования примесей установлен на уровне 0.03 %.

Учитывая достаточно жесткие пределы содержания примесей, а также необходимость хроматографического разделения как минимум трех примесей и основного компонента, возникла необходимость в использовании метода ВЭЖХ.

Энисамиума йодид является ионной молекулой, поэтому применение таких хроматографических колонок, как Discovery Суано 4.6 мм × 150 мм с размером частиц 5 мкм, Luna NH₂ 4.6 мм × 150 мм с размером частиц 5 мкм, Nova-Pack Phenyl 3.9 мм × 150 мм с размером частиц 4 мкм, с использованием подвижной фазы (вода-ацетонитрил) не привело к надеждущему удерживанию пиков основного компонента и пиков примесей.

Одним из способов решения такой задачи оказалось применение ион-парных реагентов, которые способствуют разделению ионных молекул, в том числе молекул, содержащих аминогруппу [7, 8].

В качестве ион-парных реагентов применялись тетрабутиламония гидроксид и октансульфонат натрия.

По результатам проведенных экспериментов в качестве ион-парного реагента был выбран натрия октан-1-сульфонат моногидрат, при использовании которого достигается разделение хроматографических пиков, а также обеспечиваются их характеристики, необходимые для соблюдения пригодности хроматографической системы. При использовании тетрабутиламония гидроксида сложнее было обеспечить разделение пика энисамиума с пиком бензиламида изоникотиновой кислоты. Динатрия гидрогенфосфат безводный выбран в качестве буферного реагента.

Для выбора оптимального значения рН готовили буферные растворы с рН от 2.0 до 7.0.

Оптимальное значение рН буферного раствора установлено на уровне рН 2.5, а органической составляющей элюента выбран ацетонитрил.

При понижении значения рН буферного раствора до рН 2.0 ухудшалось разделение пика энисамиума с пиком бензиламида изоникотиновой кислоты, а при повышении рН более 2.5 ухудшалось разделение пика йодид-иона с изоникотиновой кислотой. Экспериментально было

установлено, что октадецилсилильная хроматографическая колонка размером 150 мм × 4.6 мм с размером зерна 5 мкм является оптимальной, так как обеспечивалось разделение пиков и при этом время хроматографирования одного образца составляло не более 15 мин. Скорость потока подвижной фазы — 0.5 мл/мин. В процессе исследований была подтверждена необходимость использования в качестве растворителя проб подвижной фазы, что способствует улучшению чувствительности системы, увеличивая соотношение «сигнал/шум».

Оптимальная концентрация испытуемого раствора составляет 0.4 мг/мл, так как при большей концентрации, к примеру 1 мг/мл, наблюдается ухудшение симметрии пика энисамиума, что может препятствовать определению бензиламида и неизвестных примесей. При меньшей концентрации испытуемого раствора не достигается достаточная чувствительность методики, позволяющая детектировать примеси на предварительно установленном уровне — 0.05 %.

Для правильного установления длины волны детектирования были проведены работы по определению максимумов поглощения исследуемых веществ в ультрафиолетовой (УФ) и видимой (Вид) областях света.

Изучение максимумов поглощения известных примесей проводили на спектрофотометре Specord 250 Plus (Германия) [9].

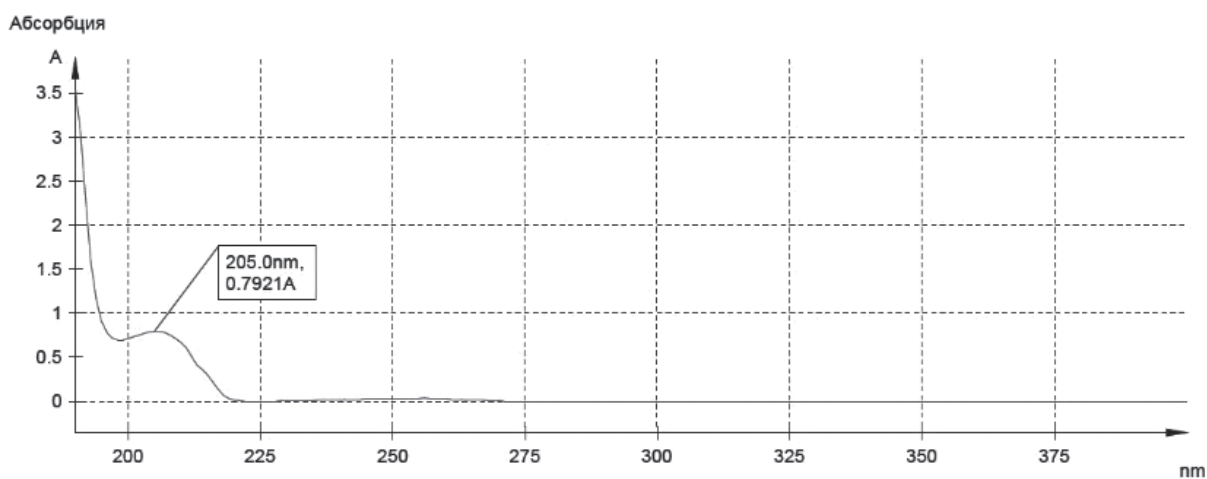
Спектры примесей представлены на Рис. 2.

Для бензиламида установлена длина волны детектирования 205 нм. Учитывая то, что поглощение бензиламида изоникотиновой кислоты при длине волны 205 нм имеет большую абсорбцию, чем при 263 нм, и учитывая необходимость достижения высокой чувствительности методики, для бензиламида изоникотиновой кислоты была установлена такая же длина детектирования, как и для бензиламида, — 205 нм.

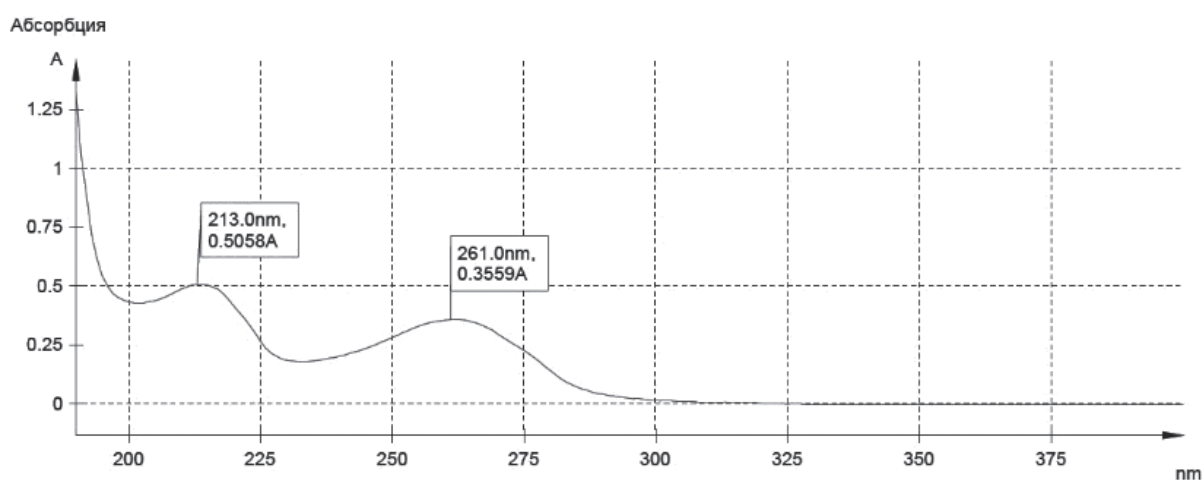
Для изоникотиновой кислоты на начальном этапе разработки предложена длина волны детектирования 261 нм, но при дополнительных исследованиях, с учетом неполного разделения изоникотиновой кислоты с йодид-ионом, а также учитывая низковолновый максимум йодид-иона, в качестве длины волны для детектирования изоникотиновой кислоты была выбрана величина 265 нм.

Чтобы установить длину волны для детектирования неизвестных примесей, а также в рамках подтверждения селективности методики касательно потенциальных неизвестных примесей, проводились стрессовые испыта-

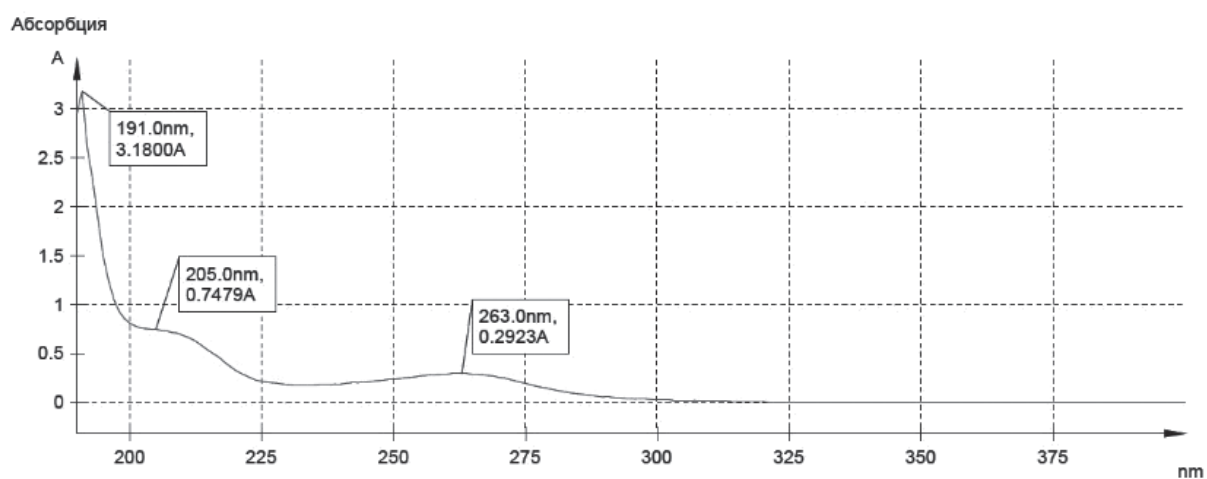
Рисунок 2



А. УФ/Вид-спектр бензиламина



В. УФ/Вид-спектр изоникотиновой кислоты



С. УФ/Вид-спектр бензиламида изоникотиновой кислоты

УФ/Вид-спектры исследуемых примесей

Таблица 3

Условия проведения стрессовых испытаний и их результаты

Условия	Временные точки контроля	Полученные продукты разложения
Температура 100 °С	0, 5, 10 суток	Бензиламин Изоникотиновая кислота
Перекись водорода 6%	0, 5, 10 суток	Бензиламин Изоникотиновая кислота Неизвестные примеси
Хлористоводородная кислота 1 М	0, 5, 10 суток	Не наблюдается образования продуктов разложения
Натрия гидроксид 0.1 М	0, 5, 10 суток	Бензиламин Изоникотиновая кислота
Влияние света	Общее воздействие света не менее 1200000 люкс/часов и источник УФ-света 200 Вт·ч/м ²	Не наблюдается образования продуктов разложения

ния: влияние повышенной температуры, воздействие окислителя, кислотный и щелочной гидролиз, а также влияние света [10].

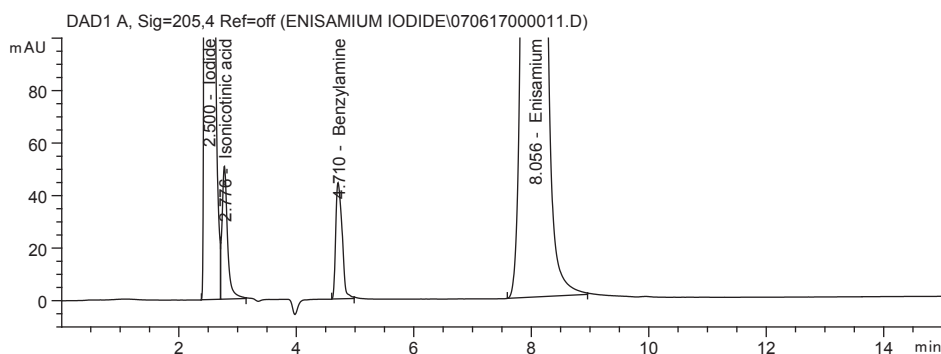
Условия стрессовых испытаний, которым подвергался энисамиума йодид, а также основные продукты разложения приведены в Табл. 3.

В результате проведения стрессовых испытаний было установлено, что субстанция энисамиума йодид стабильна и основными про-

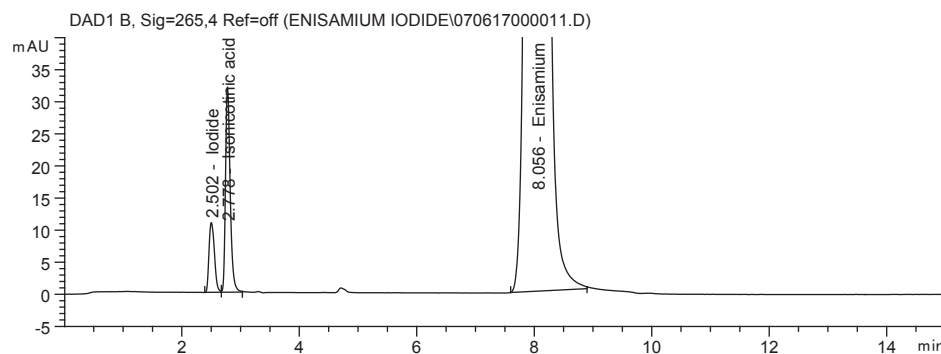
дуктами разложения являются бензиламин и изоникотиновая кислота. В связи с высокой абсорбцией исходных компонентов синтеза и промежуточного продукта при 205 нм для детектирования неизвестных примесей установлена длина волны 205 нм.

Примеры хроматограмм образца АФИ, который подвергался стрессовым испытаниям, представлены на Рис. 3.

Рисунок 3



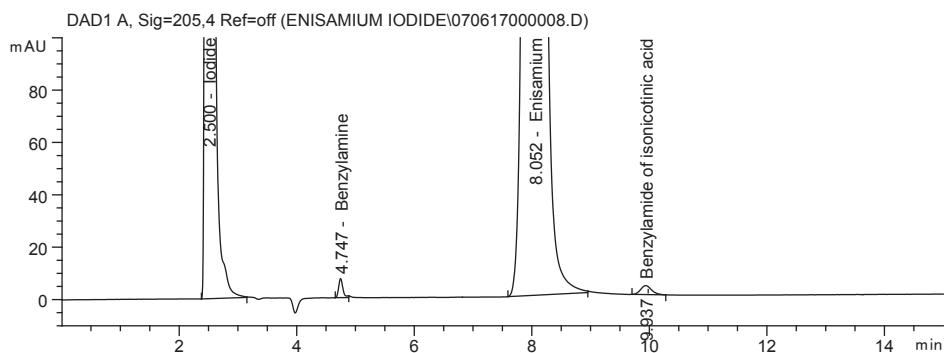
А. Хроматограмма образца АФИ после воздействия стрессовых условий (Хроматограмма при длине волны 205 нм)



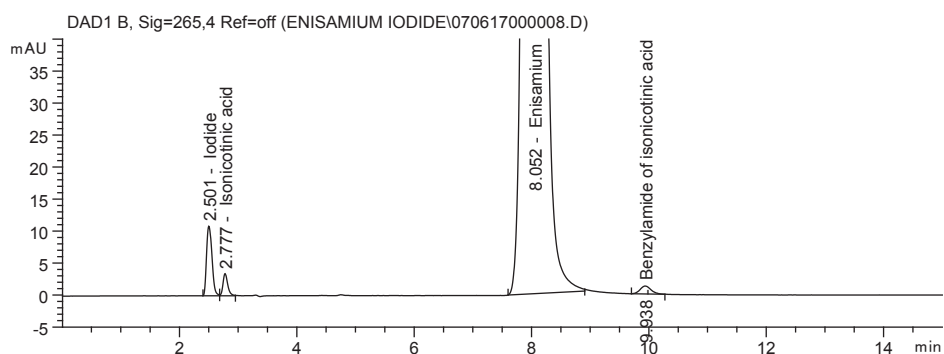
В. Хроматограмма образца АФИ после воздействия стрессовых условий (Хроматограмма при длине волны 265 нм)

Хроматограммы исследуемого раствора (образца АФИ, который подвергался стрессовым испытаниям), полученные при длинах волн 205 нм и 265 нм

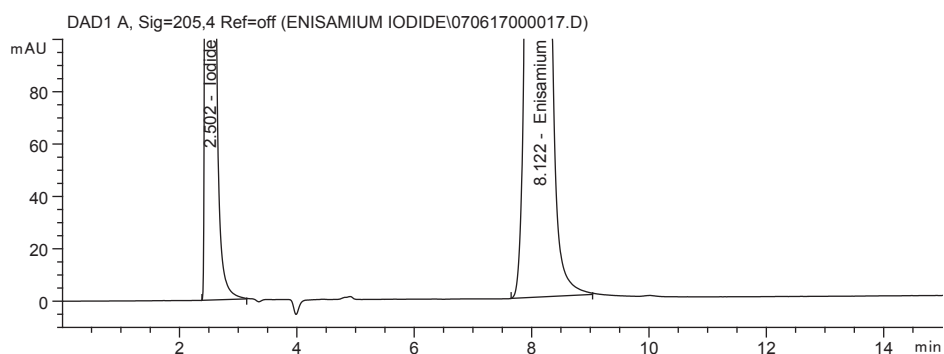
Рисунок 4



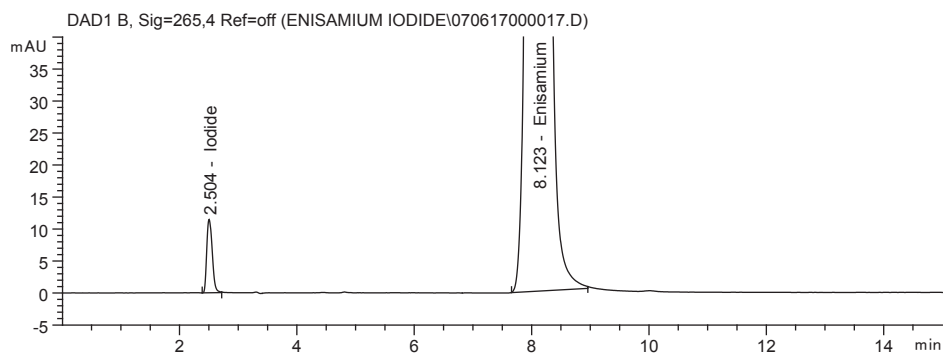
А. Хроматограмма раствора сравнения, полученная при длине волны 205 нм



В. Хроматограмма раствора сравнения, полученная при длине волны 265 нм



С. Хроматограмма испытуемого раствора, полученная при длине волны 205 нм



D. Хроматограмма испытуемого раствора, полученная при длине волны 265 нм

Хроматограммы раствора сравнения и испытуемого раствора, полученные при длинах волн 205 нм и 265 нм

Также проводилась оценка потенциальных примесей в УФ-диапазоне, отличающемся от длин волн 205 нм и 265 нм, в результате чего было подтверждено отсутствие дополнительных неизвестных примесей, которые поглощали бы в другом диапазоне детектирования. Такая оценка проводилась после получения хроматограммы с использованием диодно-матричного детектора.

Для оценки пригодности хроматографической системы готовили раствор с содержанием основных примесей на уровне 0.03 % по отношению к концентрации энисамиума йодида в испытуемом растворе.

Хроматограммы вышеупомянутого раствора сравнения и испытуемого раствора, полученные при длинах волн 205 нм и 265 нм, представлены на Рис. 4.

Для оценки пригодности хроматографической системы, а также возможности воспроизведения методики на других приборах, в том числе и в других лабораториях, были установлены требования к пригодности хроматографической системы [11].

Финальные хроматографические условия, а также методика приготовления необходимых растворов для определения сопутствующих примесей описаны ниже.

Приготовление подвижной фазы

Буферный раствор pH 2.5: 1.085 г натрия октан-1-сульфоната моногидрата и 1.000 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в 900 мл воды очищенной, доводят pH раствора фосфорной кислотой до (2.5 ± 0.05) и доводят объем раствора водой очищенной до 1000.0 мл.

Конечный состав подвижной фазы: к 300 мл буферного раствора pH 2.5 прибавляют 440 мл воды очищенной и 260 мл ацетонитрила, перемешивают и фильтруют сквозь фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Приготовление испытуемого раствора. К 0.4000 г испытуемой субстанции прибавляют 80 мл подвижной фазы, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл, перемешивают. 10.0 мл полученного раствора доводят подвижной фазой до объема 100.0 мл.

Приготовление растворов сравнения. *Приготовление промежуточного раствора бензиламина:* 0.100 г бензиламина растворяют в 10 мл ацетонитрила и доводят объем раствора подвижной фазой до 100.0 мл. 10.0 мл полученного раствора доводят подвижной фазой до объема 100.0 мл.

Приготовление промежуточного раствора бензиламида изоникотиновой кислоты: 0.010 г бензиламида изоникотиновой кислоты растворяют в 10 мл ацетонитрила и доводят объем раствора подвижной фазой до 100.0 мл.

Приготовление промежуточного раствора изоникотиновой кислоты: 0.100 г кислоты изоникотиновой растворяют в 10 мл 0.1 М раствора натрия гидроксида и доводят подвижной фазой до 100.0 мл. 10.0 мл полученного раствора доводят подвижной фазой до объема 100.0 мл.

Приготовление промежуточного раствора энисамиума йодида: 0.400 г стандартного образца энисамиума йодида растворяют в 80 мл подвижной фазы и доводят объем раствора до 100.0 мл тем же растворителем.

Приготовление конечного раствора сравнения: к 10 мл промежуточного раствора энисамиума йодида прибавляют по 0.2 мл промежуточных растворов бензиламина, бензиламида изоникотиновой кислоты и изоникотиновой кислоты, перемешивают и доводят объем раствора до 100.0 мл.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы. К 10 мл промежуточного раствора энисамиума йодида прибавляют по 0.12 мл промежуточных растворов бензиламина, бензиламида изоникотиновой кислоты и изоникотиновой кислоты, перемешивают и доводят объем раствора до 100.0 мл.

Хроматографическая колонка — Zorbax Eclipse XDB-C18 размером 150 мм × 4.6 мм, заполненная сорбентом октадецилсилильным.

Скорость потока — 0.5 мл/мин.

Длина волны детектирования — 205 нм и 265 нм.

Температура термостата колонки — 30 °С.

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы выполняются следующие условия:

- число теоретических тарелок, рассчитанное по пику бензиламина, должно быть не менее 2500 (при длине волны 205 нм);
- коэффициент симметрии пика бензиламина — от 0.8 до 1.5 (при длине волны 205 нм);
- соотношение «пик/впадина» для йодид-иона и пика изоникотиновой кислоты должно быть не менее 1.1 (при длине волны 265 нм);
- соотношение «пик/впадина» для пика энисамиума и пика бензиламида изоникотиновой кислоты должно быть не менее 1.1 (при длине волны 205 нм).

Для оценки содержания примесей площади пиков на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают с площадями пиков на хроматограмме раствора сравнения.

Выводы

Разработана методика определения сопутствующих примесей энисамиума йодида. Условия хроматографирования подобраны таким образом, что позволяют контролировать примеси в условиях единой хроматографической методики.

Проведены стрессовые испытания образца энисамиума йодида в условиях воздействия повышенной температуры, окисления, щелочного и кислотного гидролиза, воздействия света, после чего была подтверждена специфичность разработанной методики.

Проведена оценка возникновения потенциальных примесей, а также возможности контроля этих примесей в условиях разработанной методики.

Установлен предел содержания и разработана ВЭЖХ-методика контроля примесей в субстанции энисамиума йодида в соответствии с рекомендациями ICH Q3A.

Таким образом, после проведения валидации, методика может быть использована для контроля качества субстанции энисамиума йодида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Impurities in new drug substances Q3A (R2) ICH Harmonised Tripartite Guideline 2006. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. — Режим доступа: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>.
2. Boltz D. Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / D. Boltz, X. Peng, M. Muzzio [et al]: The 3rd Antivirals Congress, 12-14 October 2014. — Amsterdam, 2014. — P. 46.
3. Больц Д. Противовирусная активность энисамиума (Амизона) в отношении вирусов гриппа в дифференцированных нормальных клетках эпителия бронхов человека / Д. Больц, С. Пен, М. Музцио [и др.] // Русский медицинский журнал. — 2015. — № 2. — С. 72-74.
4. Boltz D. Antiviral Effect of a Derivative of Isonicotinic Acid Enisamium Iodide (FAV00A) Against Influenza Virus / D. Boltz, D. Cocking, J. Cinatl [et al]: The 5th ISIRV AVG Conference, 14-16 June 2017. — Shanghai, 2017. — P. 56.
5. Пат. 104102 Україна, МПК С07D 213/81 (2006.01). α -Кристалічна форма карбабензпіриду / Жебровська Ф.І., Маргітич В.М., Костюк Г.В., Сяркевич О.Р., Ванат М.Д. — Заявл. 15.06.2011; опубл. 25.12.2013.
6. Компендиум 2016 — Лекарственные препараты / под ред. В.Н. Коваленко. — К.: Морион, 2016. — 2416 с.
7. Смоленков А.Д. Закономерности удерживания 1,1-диметилгидразина и продуктов его разложения на силикагелях с привитыми алкильными группами в режиме ион-парной хроматографии / А.Д. Смоленков, С.А. Пономаренко, О.А. Шпигун // Журнал физической химии. — 2009. — № 3. — С. 565-774.
8. Cecchi T. Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography / T. Cecchi, F. Pucciarelli, P. Passamonti // Anal. Chem. — 2001. — Iss. 73. — P. 2632-2639.

9. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМП, 2011. — Т. 1. — 464 с.

10. Guidance for Industry Q1B. Photostability Testing of New Drug Substances and Products. — US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, 1996.

11. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.

УДК 543.612:543.544.5.068.7:615.238

Резюме

Бурмака О. В., Гурєєва С. М., Маргітич В. М.
ПАТ «Фармак», м. Київ

Розробка методики контролю супровідних домішок субстанції енिसаміуму йодиду

Розроблено методику контролю домішок субстанції енисаміуму йодиду з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Склад рухомої фази, швидкість її потоку, тип хроматографічної колонки підбрано таким чином, щоб визначати домішки в єдиних хроматографічних умовах.

Вибрано довжини хвиль, що є оптимальними для детектування домішок. Також підбрана концентрація випробовуваного розчину. Успішно вибрано іон-парний реагент, що забезпечує достатній час утримання піків домішок, а також піків основного компонента.

У результаті проведених стресових випробувань, коли субстанцію піддавали впливу підвищеної температури, окисненню, кислотному та лужному гідролізу, а також впливу світла, підтверджено, що методика є специфічною щодо визначення продуктів деградації субстанції енисаміуму йодиду.

Встановлено допустимі межі вмісту домішок для субстанції енисаміуму йодиду відповідно до рекомендацій Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (ICH).

Ключові слова: енисаміуму йодид, субстанція, ICH Q3A, супровідні домішки, ВЕРХ.

UDC 543.612:543.544.5.068.7:615.238

Summary

Burmaka O. V., Gureyeva S. M., Margitich V. M.
Farmak JSC, Kiev, Ukraine

Development of HPLC method for the determination of related substances in API enisamium iodide

The HPLC method was developed, where sodium 1-octanesulfonate was used as an ion-pair reagent. The pH of buffer solution was 2.5, and acetonitrile was chosen as an organic part of mobile phase. For detection of benzylamine, isonicotinic acid benzylamide and unknown impurities the wavelength 205 nm was chosen. Wavelength 265 nm was provided for detection of isonicotinic acid.

The composition of mobile phase, its flow rate and kind of the chromatographic column was chosen in such manner, that it is possible to control benzylamine, isonicotinic acid and isonicotinic acid benzylamide in the same conditions.

The limits of impurities for the substance enisamium iodide were established in accordance with ICH Q3A at the level not more than 0.05 % of each impurity. The potential impurities are benzylamine, isonicotinic acid and isonicotinic acid benzylamide.

On the base of the results force degradation study, the developed method is selective. The present method can be used for control API of enisamium iodide.

Keywords: enisamium iodide, substance, ICH Q3A, related substances, HPLC.

Бурмака Алексей Васильевич. Ведущий инженер центральной лаборатории фармацевтической разработки ПАО «Фармак».

Гуреева Светлана Николаевна. Д. фарм. н. (2017). Начальник центральной лаборатории фармацевтической разработки ПАО «Фармак».

Маргитич Виктор Михайлович. Д. мед. н. (2005). Главный научный консультант ПАО «Фармак».

УДК 661.12.011 : [615.454.1 : 615.276].074

Зинченко И. А., Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П.
Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс “Институт монокристаллов” НАН Украины», Харьков, Украина

Валидация аналитической методики количественного определения примесей кетопрофена методом жидкостной хроматографии

Проведена валидация разработанной ранее методики предельного определения примесей кетопрофена методом жидкостной хроматографии как количественного испытания неидентифицированных примесей, определяемых по кетопрофену, примеси А и кетопрофена этилового эфира. Исследованы такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, сходимость, внутрилабораторная прецизионность и линейность в требуемых диапазонах применения; установлены также пределы количественного определения указанных веществ. Результаты валидации подтвердили корректность методики количественного определения примесей кетопрофена. Оценена стабильность исследованных модельных растворов.

Ключевые слова: кетопрофен, примесь А, кетопрофена этиловый эфир, неидентифицированная примесь, аналитическая методика, валидация, специфичность, диапазон применения, сходимость, внутрилабораторная прецизионность, линейность, предел количественного определения, стабильность.

Кетопрофен и декскетопрофен, который является S(+)-энантиомером кетопрофена, являются нестероидными противовоспалительными средствами и входят в составы многих препаратов в разных лекарственных формах, в частности, гелей для наружного применения [1, 2, 3]. Кетопрофен представляет собой (2R,S)-2-(3-бензоилфенил)пропановую кислоту (рацемическую смесь двух энантиомеров) и стандартизован в монографии «Ketoprofen» Европейской Фармакопеи [4]. В этой монографии приведены структурные формулы и названия 12 сопутствующих примесей кетопрофена, которым даны буквенные обозначения: А, В, С, D, E, F, G, H, I, J, K, L. Это примеси, которые образуются или потенциально могут образовываться при производстве кетопрофена. В разделе «Related substances» («Сопутствующие примеси») указанной монографии к специфицированным примесям отнесены примеси А, В, С, D, E, F, предельное содержание каждой из которых, определяемое методом жидкостной хроматографии, нормируется на уровне не более 0.2 %. Предельное содержание любой другой неспецифицированной примеси установлено на уровне не более 0.1 %. Суммарное содержание всех примесей (кроме примесей А и С) должно быть не более 0.4 %. Не учитываются сопутствующие примеси с содержанием ≤ 0.05 % [4].

Кетопрофен содержит карбоксильную группу и образует соли с органическими и неорганическими основаниями, а также сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы [5]. Поскольку основным компонентом основ для гелей кетопрофена является этанол, в разделе «Related substances» монографии «Ketoprofen Gel» Британской Фармакопеи предусмотрено определение методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) кетопрофена этилового эфира (КЭЭ), содержание которого нормируют не более 4 % [6]. Содержание одной неидентифицированной примеси (НИП) должно быть не более 0.5 %; кроме того, допускается не более трех НИП с содержанием не более 0.2 % каждая.

Следует отметить, что на этапе фармацевтической разработки новых лекарственных препаратов с кетопрофеном или декскетопрофеном может возникнуть необходимость ввести в состав препарата вспомогательные вещества, содержащие гидроксильные группы, например гликоли. Так, в составе препарата «Кетопром гель 2.5 %» (№ UA/6556/01/01 от 11.06.2007 г.; «ГлаксосмитКляйн Фармасьютикалз С.А.», Польша) содержится пропиленгликоль [1], который потенциально может образовывать сложные эфиры с кетопрофеном. Ранее нами было показано, что при воздействии стрессовых факторов на гель декскетопрофена (УФ-облучение,

повышенная температура и др.), кроме КЭЭ, образуются такие продукты разложения кетопрофена, как примесь А и две НИП [7].

При разработке новых препаратов следует количественно определять образующиеся продукты разложения, чтобы установить, превышает ли их содержание пороги информирования, идентификации и квалификации [8]. Рационально количественно определять каждую из сопутствующих примесей в новых лекарственных препаратах и в препаратах-генериках, когда нормируют их сумму и содержание отдельных примесей суммируют. Кроме того, необходимо количественно определять продукты разложения, если они являются достаточно токсичными веществами.

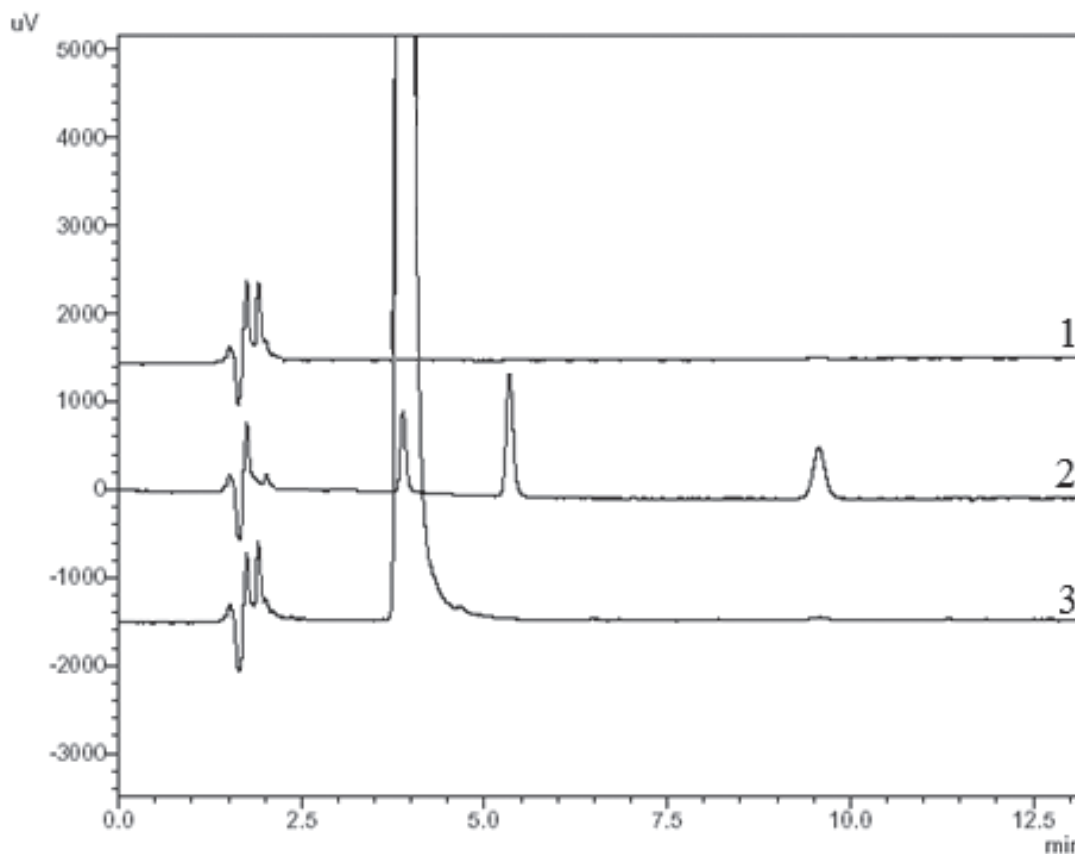
Ранее нами были проведены исследования по валидации методики определения сопутствующих примесей кетопрофена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как предельного испытания [9], резуль-

таты которых подтвердили корректность этой методики [7]. Цель данной работы — исследования по валидации аналитической методики определения сопутствующих примесей кетопрофена методом ВЭЖХ как количественного испытания [9].

Объекты и методы

В качестве объектов исследований использовали: стандартный образец (СО) кетопрофена (*BP CRS*; Cat. № 668), СО кетопрофена примеси А (далее — примесь А) (*EP CRS*; Cat. № K2000010), СО кетопрофена этилового эфира (далее — КЭЭ) (*BP CRS*; Cat. № 667), а также модельные растворы указанных СО в метаноле *P2*. Использовали 2 серии модельных растворов: 1) 9 модельных растворов, содержащих кетопрофен в концентрациях от 0.05 % до 0.25 %, примесь А в концентрациях от 0.05 % до 0.25 % и КЭЭ в концентрациях от 0.05 % до 1.00 %;

Рисунок 1



Хроматограммы, полученные в условиях количественного определения примесей кетопрофена: 1 — раствора плацебо (раствор основы геля); 2 — раствора сравнения, содержащего СО кетопрофена, примеси А и КЭЭ; 3 — испытуемого раствора геля кетопрофена 2.5 % (препарата «Ноби гель»[®], гель 2.5 %)

Примечание: пик со временем удерживания (R_t) около 4.0 мин соответствует кетопрофену; пик с $R_t \approx 5.5$ мин — примесь А, пик с $R_t \approx 9.5$ мин — КЭЭ.

2) 9 модельных растворов, содержащих КЭЭ в концентрациях от 1.0 % до 5.0 %.

Для исследований специфичности использовали также разработанный нами препарат «Ноби гель»[®], гель 2.5 %, [1, 2] и основы гелей, содержащие карбомер, органическое основание (нейтрализатор карбомера), эфирные масла (отдушки) и смешанный растворитель, состоящий из воды очищенной, *N*-метилпирролидона и одного из гидрофильных неводных растворителей: этанола (96 %), пропиленгликоля, глицерина, диметилсульфоксида, макрогола 400 и диэтиленгликоля моноэтилового эфира [4, 10]. Основы гелей готовили диспергированием карбомера в воде с дальнейшим его набуханием, смешиванием дисперсии с гидрофильными растворителями и нейтрализацией карбомера водным раствором органического основания до определенного pH при перемешивании. Для изготовления основы геля использовали турбинную мешалку Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG).

Концентрацию в модельных растворах примеси А, КЭЭ и кетопрофена, по которому определяли содержание НИП, определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе модели LC-2030C 3D фирмы Shimadzu, оснащенном диодно-матричным детектором, по разработанной нами методике [7]. При определении внутрилабораторной прецизионности использовали также хроматограф модели LC-2010C HT фирмы Shimadzu со спектрофотометрическим детектором.

Валидацию разработанной аналитической методики количественного определения примесей кетопрофена проводили в соответствии с принятым методологическим подходом [9].

Результаты исследований и их обсуждение

Специфичность методики количественного определения примесей кетопрофена в гелях методом ВЭЖХ подтверждается хроматограммами, представленными на Рис. 1.

На хроматограммах *растворов плацебо*, одна из которых представлена на Рис. 1, отсутствуют пики, времена удерживания которых совпадают со временами удерживания пиков СО кетопрофена, примеси А и КЭЭ (Рис. 1). То есть, компоненты гелевых основ не мешают количественному определению кетопрофена и его примесей (примеси А и КЭЭ).

Характеристики правильности, сходимости и линейности исследовали на модельных растворах с концентрациями примеси А и кетопрофена в пределах от 0.05 % до 0.25 % и с концентрациями КЭЭ от 0.05 % до 5.0 % от принятого

содержания кетопрофена в препаратах, которое составляет 2.5 г в 100 г геля [1, 2].

При обосновании минимально допустимого диапазона применения методики исходили из требований к содержанию сопутствующих примесей кетопрофена, установленных в монографии «Ketoprofen Gel» Британской Фармакопеи [6]. Так, содержание единичной НИП в соответствии с указанной монографией не должно превышать 0.2 %, следовательно диапазон применения методики для НИП кетопрофена составляет от 0.05 % до 0.25 % (от 25 % до 125 % от предельно допустимой концентрации 0.2 %) [9].

При обосновании минимально допустимого диапазона применения методики количественного определения примеси А исходили из требований, установленных в монографии «Ketoprofen» Европейской Фармакопеи (не более 0.2 %) [4]. Соответственно, диапазон применения методики количественного определения примеси А также составил от 0.05 % до 0.25 %.

Предельное содержание любой идентифицированной специфицированной примеси в субстанции кетопрофена в соответствии с монографией «Ketoprofen» Европейской Фармакопеи должно быть не более 0.2 % [4]. Логично, чтобы предельное содержание КЭЭ, который также является идентифицированной специфицированной примесью в гелях, при выпуске препарата нормировалось на уровне не более 0.2 %, а в течение срока хранения препарата — не более 4 %, что предусмотрено в монографии «Ketoprofen Gel» Британской Фармакопеи [6]. Поскольку требования к предельному содержанию КЭЭ в препарате существенно отличаются при выпуске и в течение срока хранения (0.2 % и 4.0 % соответственно), валидационные параметры изучали в двух диапазонах применения с использованием двух растворов сравнения: 1) в диапазоне концентраций от 0.05 % до 1.0 % и с концентрацией КЭЭ в растворе сравнения 0.2 %; 2) в диапазоне концентраций от 1.0 % до 5.0 % и с концентрацией КЭЭ в растворе сравнения 4.0 %.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) критерии приемлемости рассчитывали для $\Delta_{\text{imp}} \leq 5\%$ [9].

Для оценки *сходимости* использовали относительный доверительный интервал (Δ_z), который должен быть меньше максимально допустимой неопределенности результатов анализа (Δ_{As}), составляющей 5.0 %.

Для оценки *правильности* определяли степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по дан-

ной методике. Правильность методики определяется величиной отношения «найденного» к «введенному» Z (%) с доверительным интервалом. Методика не должна иметь значимой систематической погрешности (Δ %); величина $\Delta \% = |\bar{Z} - 100|$ не должна значимо отличаться от нуля. Правильность оценивали по двум критериям:

1. *Критерий статистической незначимости.* Величина Δ % статистически неотличима от нуля, если отклонение \bar{Z} от 100 % не превышает доверительный интервал, то есть для 9 модельных растворов должно выполняться неравенство:

$$\delta \% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3}.$$

2. *Критерий практической незначимости.* Если не выполняется требование к критерию статистической незначимости, используют критерий практической незначимости по сравне-

нию с максимально допустимой неопределенностью анализа: то есть, должно выполняться неравенство: $\Delta \% \leq 0.32 \times 5.0 = 1.6 \%$.

Результаты исследований *сходимости* и *правильности* даны в Табл. 1.

Как следует из Табл. 1, методика количественного определения сопутствующих примесей кетопрофена (примеси А, КЭЭ и НИП) характеризуется достаточной сходимостью в исследованных диапазонах концентраций, так как найденные значения относительных доверительных интервалов (Δ_z) величины \bar{Z} меньше критического значения 5.0 %. Методика также характеризуется достаточной правильностью, так как величины систематической погрешности (Δ) соответствуют требованиям критериев статистической и практической незначимости.

Предусмотрены несколько требований к линейности [9]. Зависимость между взятым (X_i) и найденным (Y_i) количеством определяемого вещества в области действия методики должна быть линейной:

Таблица 1

Результаты анализа модельных растворов, содержащих кетопрофен, примесь А и КЭЭ, а также модельных растворов, содержащих только КЭЭ в диапазоне концентраций от 1.0 % до 5.0 %, в нормализованных координатах, их статистическая обработка и оценка

Номер модельного раствора ($n = 9$)	Найдено в % к введенному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$			
	Кетопрофен (НИП) (диапазон 0.05–0.25 %)	Примесь А (диапазон 0.05–0.25 %)	КЭЭ (диапазон 0.05–1.00 %)	КЭЭ (диапазон 1.0–5.0 %)
№ 1	104.86	97.99	100.58	98.18
№ 2	96.79	100.17	102.96	102.47
№ 3	98.19	98.69	102.79	102.20
№ 4	99.98	98.63	99.05	99.05
№ 5	98.25	102.76	100.91	103.70
№ 6	101.35	99.10	97.52	101.78
№ 7	97.37	99.74	99.31	97.65
№ 8	100.40	100.00	100.73	97.85
№ 9	99.04	101.42	99.39	101.26
Показатели и критерии приемлемости (оценка методики)				
Среднее значение (Z_{cp})	99.58 %	99.83 %	100.36 %	100.46 %
$\Delta = Z_{cp} - 100 $	0.42 %	0.17 %	0.36 %	0.46 %
RSD_z	2.473 %	1.499 %	1.761 %	2.277 %
$\Delta_z = t(95 \%, n - 1) \times RSD_z$	4.599 %	2.787 %	3.275 %	4.234 %
Δ_{As}	5.0 %			
Оценка сходимости: $\Delta_z \leq 5.0 \%$	4.599 % < 5.0 %	2.787 % < 5.0 %	3.275 % < 5.0 %	4.234 % < 5.0 %
Оценка правильности*: 1. $\delta \leq \Delta_z/\sqrt{n}$ 2. $\delta \leq 0.32 \times 5.0 \%$	0.42 % < 1.53 % 0.42 % < 1.6 %	0.17 % < 0.93 % 0.17 % < 1.6 %	0.36 % < 1.09 % 0.36 % < 1.6 %	0.46 % < 1.41 % 0.46 % < 1.6 %
Оценка методики:	Корректна	Корректна	Корректна	Корректна

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

Свободный член (*a*) должен быть статистически неотличим от нуля и его значение оценивают по двум критериям:

1. Критерий статистической незначимости.

Величина *a* статистически незначимо отличается от нуля, если выполняется неравенство:

$$\alpha \leq \Delta_a = t(95\%, n-2) \times S_a = 1.8946 \times S_a,$$

где S_a — стандартное отклонение для отрезка, который отсекается на оси ординат (для рассчитанной регрессионной прямой).

2. Критерий практической незначимости.

Если не выполняется требование к критерию статистической незначимости для свободного члена (*a*), используют критерий практической незначимости. Вклад свободного члена (*a*) в неопределенность результата анализа должен быть незначимым в сравнении с максимально допустимой неопределенностью результатов анализа. Для $X_{\min} = 25\%$ должно выполняться неравенство:

$$a \leq \frac{0.32 \times \Delta_{AS}(\%)}{1 - (X_{\min} / 100)} = \frac{0.32 \times 5.0}{1 - (25 / 100)} = 2.13.$$

Требования к *остаточному стандартному отклонению* (SD_0) и *коэффициенту корреляции* (*r*) рассчитывали в соответствии с требованиями ГФУ [9].

Результаты исследования линейности представлены в Табл. 2.

Как следует из Табл. 2, методика количественного определения кетопрофена (НИП),

примеси А и КЭЭ соответствует критериям приемлемости к параметрам линейной зависимости: *свободному члену a*, *остаточному стандартному отклонению* (SD_0) и *коэффициенту корреляции* (*r*), то есть линейность методики подтверждается в диапазоне концентраций от 0.05 % до 0.25 % от содержания кетопрофена в препарате для НИП и примеси А, а также от 0.05 % до 5.0 % для КЭЭ.

На основании результатов, полученных при изучении линейности, был рассчитан предел количественного определения (ПКО) для примеси А, КЭЭ и кетопрофена (НИП). ПКО в процентах от максимально допустимого содержания примеси (в нормализованных координатах) рассчитывали по формуле [9]:

$$\text{ПКО} = 10 \times S_a / b.$$

ПКО для кетопрофена (НИП) составляет:

$$\begin{aligned} \text{ПКО} &= 10 \times 1.0947\% / 0.98973 = \\ &= 11.061\% \leq 32\% (\text{max ПКО}). \end{aligned}$$

ПКО в нормализованных координатах для кетопрофена (НИП) составляет 11.061 %, что соответствует 0.022 % от номинального содержания кетопрофена в препарате (2.5 г/100 г).

ПКО для примеси А составляет:

$$\begin{aligned} \text{ПКО} &= 10 \times 0.8657\% / 1.01353 = \\ &= 8.541\% \leq 32\% (\text{max ПКО}). \end{aligned}$$

ПКО в нормализованных координатах для примеси А составляет 8.541 %, что соответствует 0.017 % от номинального содержания кетопрофена в препарате.

ПКО для КЭЭ составляет:

$$\begin{aligned} \text{ПКО} &= 10 \times 1.17454\% / 0.99704 = \\ &= 11.780\% \leq 32\% (\text{max ПКО}). \end{aligned}$$

Таблица 2

Метрологические характеристики линейной зависимости ($Y_i = b \times X_i + a$) найденных концентраций кетопрофена, примеси А и КЭЭ от их введенных концентраций и их оценка в соответствии с критериями приемлемости

Параметры и критерии приемлемости	Кетопрофен (диапазон 0.05–0.25 %)	Примесь А (диапазон 0.05–0.25 %)	КЭЭ (диапазон 0.05–1.00 %)	КЭЭ (диапазон 1.0–5.0 %)
<i>b</i>	0.98973	1.01353	0.99704	0.99115
S_b	0.01351	0.01078	0.00467	0.01966
α	0.27343	–0.89593	0.22357	0.94422
S_a	1.09470	0.86570	1.17454	1.68631
SD_0	1.31536	1.04022	2.38452	1.99972
<i>r</i>	0.99935	0.99960	0.99992	0.99863
Оценка <i>a</i>: 1. $a \leq \Delta_a = 1.8946 \times S_a$ 2. $a \leq 2.13$	0.27343 < 2.07 0.27343 < 2.13	–0.89593 < 1.64 –0.89593 < 2.13	0.22357 < 2.23 0.22357 < 2.13	0.94422 < 3.20 0.94422 < 2.13
Оценка SD_0: $SD_0 \leq \Delta_{AS} / 1.8946$	1.31536 < 2.64	1.04022 < 2.64	2.38452 < 2.64	1.99972 < 2.64
Оценка <i>r</i>:	0.99935 > 0.99817	0.9996 > 0.99817	0.99992 > 0.99988	0.99863 > 0.99703
Оценка методики:	Корректна	Корректна	Корректна	Корректна

ПКО в нормализованных координатах для КЭЭ составляет 11.780 %, что соответствует 0.024 % от номинального содержания кетопрофена в препарате.

Таким образом, значения ПКО для кетопрофена, по которому определяют НИП, примеси А и КЭЭ соответствуют критерию приемлемости (не более 32 %), установленному в ГФУ [9].

В соответствии с требованиями ГФУ [9] была также изучена внутрилабораторная прецизионность методики количественного определения сопутствующих примесей. Для подтверждения внутрилабораторной прецизионности доверительный интервал результатов (Z), полученных в разных условиях, не должен превышать максимально допустимую неопределенность методики анализа $\max \Delta_{imp}$. Для этого анализируют по методике $n = 9$ образцов одной и той же серии модельных растворов в $m = 2$ разных дня. Исследование проводят разные аналитики, на разном оборудовании. Все полученные результаты должны принадлежать одной и той же генеральной совокупности. Поэтому для них рассчитывают объединенное среднее значение (Z_{intra}), стандартное отклонение ($SD_{Z-intra}$) и относительный доверительный интервал (Δ_{intra} %). Величина Δ_{intra} не должна превышать $\max \Delta_{imp}$.

$$\Delta_{intra} = t[(95\%, n \times m - 1)] \times SD_{Z-intra} = 1.7396 \times SD_{Z-intra} \leq \max \Delta_{imp}$$

Результаты исследования внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики представлены в Табл. 3.

Как следует из данных Табл. 3, внутрилабораторная прецизионность методики количественного определения кетопрофена (НИП), примеси А и КЭЭ соответствует критерию приемлемости (не более 5.0 %), установленному в ГФУ [9].

Дополнительно была оценена стабильность растворов. Положительные результаты, полученные при исследовании сходимости, правильности и линейности, являются подтверждением необходимой стабильности растворов, так как время, затраченное при приготовлении и хроматографировании 10 растворов (9 модельных растворов и раствора сравнения), существенно превышает время анализа нескольких образцов при рутинных испытаниях [11]. С учетом того, что время хроматографирования составляет 20 мин [7], а для одного раствора снимают три хроматограммы, общее время хроматографирования 10 растворов (t) составляет: $t = 10 \times 3 \times 20 \text{ мин} = 600 \text{ мин}$ (10 часов).

Другим доказательством стабильности растворов является практически незначимое различие величин Z для первого и последнего хроматографируемого растворов ($|\Delta Z_i| \leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{As}$) [11].

Расчет и оценка стабильности исследованных модельных растворов представлены в Табл. 4.

Как видно из данных Табл. 4, исследованные модельные растворы можно считать стабильными на протяжении всего времени анализа,

Таблица 3

Расчет параметров внутрилабораторной прецизионности для методики определения кетопрофена, примеси А и КЭЭ в нормализованных координатах

Номер раствора, показатели и оценка методики	Найдено в % к введенному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$							
	Кетопрофен (диапазон 0.05–0.25 %)		Примесь А (диапазон 0.05–0.25 %)		КЭЭ (диапазон 0.05–1.00 %)		КЭЭ (диапазон 1.0–5.0 %)	
1	104.86	100.99	97.99	101.68	100.58	100.23	98.18	100.12
2	96.79	98.29	100.17	104.7.0	102.96	101.58	102.47	101.47
3	98.19	99.75	98.69	100.88	102.79	101.87	102.20	102.56
4	99.98	101.02	98.63	100.45	99.05	100.35	99.05	100.14
5	98.25	99.7.0	102.76	99.21	100.91	101.69	103.7.0	102.55
6	101.35	97.73	99.1.0	100.13	97.52	98.62	101.78	100.96
7	97.37	102.18	99.74	100.79	99.31	100.02	97.65	98.54
8	100.4.0	103.4.0	100.0	98.62	100.73	100.31	97.85	96.57
9	99.04	98.39	101.42	103.91	99.39	100.68	101.26	100.11
Среднее	99.58	100.16	99.83	101.15	100.36	100.59	100.46	100.34
Объединенное среднее, Z_{intra}	99.87		100.49		100.48		100.40	
S_{Z_i} %	2.473	1.898	1.499	1.989	1.761	1.013	2.276	1.900
$SD_{Z-intra}$ %	2.158		1.840		1.398		2.035	
Δ_{intra} %	3.754		3.201		2.432		3.540	
Оценка методики:	3.754 \geq 5.0 %		3.201 \geq 5.0 %		2.432 \geq 5.0 %		3.540 \geq 5.0 %	

Таблица 4

Расчет и оценка стабильности растворов

Вещество	Z _{first}	Z _{last}	\Delta Z _i	\Delta Z _i ≤ √2 × max Δ _{As}	Вывод
Кетопрофен (НИП)	104.86	99.04	5.82	5.82 < 7.07	Стабильны
Примесь А	97.99	101.42	3.43	3.43 < 7.07	Стабильны
КЭЭ (диапазон 0.05 – 1.0 %)	100.58	99.39	1.19	1.19 < 7.07	Стабильны
КЭЭ (диапазон 1.0 – 5.0 %)	98.18	101.26	3.08	3.08 < 7.07	Стабильны

так как значения ΔZ_i не превышают критической величины:

$$\Delta Z_i < \sqrt{2} \times \max \Delta_{As} = 7.07.$$

Результаты валидационных исследований методики количественного определения сопутствующих примесей кетопрофена методом ВЭЖХ позволяют считать ее корректной по таким валидационным характеристикам, как «специфичность», «сходимость», «внутрилабораторная прецизионность», «правильность», «линейность в указанных диапазонах применения», а также по характеристике «предел количественного определения». Исследованные растворы были стабильны в течение, как минимум, 10 часов.

Выводы

1. Показано, что в ряде случаев в лекарственных препаратах следует количественно определять продукты разложения, например чтобы определить, превышает ли их содержание пороги информирования, идентификации и квалификации после истечения срока хранения нового препарата, при образовании достаточно токсичных продуктов разложения, а также в случае нормирования суммы примесей. Это требует валидации аналитических методик определения сопутствующих примесей как количественного испытания.

2. Отмечено, что кетопрофен, который является органической кислотой, потенциально может образовывать сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы, которые становятся примесями в лекарственных препаратах. Британская Фармакопея в монографии «Ketoprofen Gel» нормирует только предельное содержание кетопрофена этилового эфира и неидентифицированных примесей методом ТСХ. В целях разработки новых лекарственных препаратов с кетопрофеном или декскетопрофеном в форме гелей необходима валидированная методика количественного определения их продуктов разложения.

3. Проведена валидация разработанной ранее методики предельного определения примесей кетопрофена методом жидкостной хроматографии как количественного испытания неидентифицированных примесей, определяемых по кетопрофену, примеси А и кетопрофена этилового эфира. Исследованы такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, сходимость, внутрилабораторная прецизионность и линейность в требуемых диапазонах применения; установлены также пределы количественного определения указанных веществ. Результаты валидации подтвердили корректность методики количественного определения примесей кетопрофена.

4. Оценена стабильность исследованных модельных растворов кетопрофена, примеси А и кетопрофена этилового эфира. Показано, что растворы стабильны, как минимум, в течение 10 часов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua/>. – Загл. с экрана (дата обращения 02.08.2017).
2. Компендиум 2016 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко. – К.: МОРИОН, 2016. – 2416 с.
3. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. Sweetman S.C. – London: Pharmaceutical Press, 2009. – 3694 p.
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe. 67075 Strasbourg Cedex. France 2016. – 4016 p.
5. Робертс Дж., Касерио М. Основы органической химии. – М.: Мир, 1968. – Часть 1. – 517 с.
6. Ketoprofen Gel // British Pharmacopoeia. – 2017. – V. III.
7. Зинченко И.А., Ляпунов Н.А. Аналитические методики определения декскетопрофена и сопутствующих примесей в геле: валидация и применение на этапе разработки препарата // Фармаком. – 2015. – № 3/4. – С. 12-20.
8. СТ-Н МОЗУ 42-3.9:2014. – Лікарські засоби. Домішки в нових лікарських речовинах та нових лікарських препаратах / М. Ляпунов, О. Антіпова, О. Баула та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. – Київ: МОЗ України, вид-во «МОРИОН». 2016. – Т. 1. – С. 337-372.
9. 5.3.N.2. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 910-929.
10. Pharmaceutical Excipients / Eds. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen. – Pharmaceutical Press. London, 2006 (Electronic version).
11. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. – Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. – 396 с.

УДК 661.12.011 : [615.454.1 : 615.276].074

Резюме

Зінченко І. О., Ляпунов М. О., Безугла О. П.

Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс "Інститут монокристалів" НАН України», Харків, Україна

Валідація аналітичної методики кількісного визначення домішок кетопрофену методом рідинної хроматографії

Проведено валідацію розробленої раніше методики граничного визначення домішок кетопрофену методом рідинної хроматографії як кількісного випробування неідентифікованих домішок, які визначають за кетопрофеном, домішки А та кетопрофену етилового ефіру. Досліджено такі валідаційні характеристики, як специфічність, правильність, збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність та лінійність в потрібних діапазонах застосування; встановлено також межі кількісного визначення зазначених речовин. Результати валідації підтвердили коректність методики кількісного визначення домішок кетопрофену. Оцінено стабільність досліджених модельних розчинів.

Ключові слова: кетопрофен, домішка А, кетопрофену етиловий ефір, неідентифікована домішка, аналітична методика, валідація, специфічність, діапазон застосування, збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність, лінійність, межа кількісного визначення, стабільність.

UDC 661.12.011 : [615.454.1 : 615.276].074

Summary

Zinchenko I. O., Lyapunov M. O., Bezuglaya O. P.

State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Validation of the analytical procedure for the quantification of ketoprofen impurities by liquid chromatography

In certain cases the degradation products of active substances should be quantified in medicinal products, for example, in order to determine whether their content exceeds the information threshold, identification threshold and/or qualification threshold if toxic degradation products are present after the new product expiration date as well as in case of total impurities determination. In such cases the validation of analytical procedures for quantitative determination of the impurities is necessary.

It is noted that ketoprofen as an organic acid can potentially form esters with substances containing hydroxyl groups; in medicinal products such ketoprofen esters are considered as impurities. In the monograph «Ketoprofen Gel» of the British Pharmacopoeia only requirements for the limits for ketoprofen ethyl ester and unspecified impurities is established; these substances are determined by thin layer chromatography. In order to develop new drugs with ketoprofen or dexketoprofen in the form of gels, a validated procedure for the quantitative

determination of their degradation products is necessary. During the development of new medicinal products in the such dosage form as gel with ketoprofen or dexketoprofen as active substance, a validated analytical procedure for the quantitative determination of degradation products is necessary.

Validation of the developed procedure for quantification of ketoprofen impurity A, ketoprofen ethyl ether as well as quantitative determination of unspecified impurities (which are determined by ketoprofen) has been carried out. Such validation characteristics as specificity, accuracy, repeatability, intermediate precision and linearity have been studied in the necessary ranges as well as the quantitation limits for these substances have been determined. The specificity of the analytical procedure has been determined with respect to the components of the gel vehicles, including such hydrophilic non-aqueous solvents as ethanol (96 %), propylene glycol, glycerol, macrogol 400, diethylene glycol monoethyl ether, dimethylsulfoxide, N-methylpyrrolidone.

The correctness of the analytical procedure for the quantitative determination of ketoprofen impurities has been confirmed by the results of validation studies. The stability of the model test solutions has been determined; these solutions are stable for at least 10 hours.

Keywords: ketoprofen, impurity A, ketoprofen ethyl ester, unidentified impurity, analytical procedure, validation, specificity, range, repeatability, intermediate precision, linearity, quantitation limit, stability.

Зінченко Ігорь Александрович. Окончил Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, химический факультет (2013). Инженер лаборатории технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

Ляпунов Николай Александрович. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1972). Д. фарм. н. (1990), профессор (1993). Заслуженный научный консультант Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

Безуглая Елена Петровна. Окончила Харьковский государственный фармацевтический институт (1990). К. фарм. н. (1996), ст. науч. сотр. (2000). Зав. лабораторией технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2017).

УДК 615.357.011.5

Ляпунова А. Н., Безуглая Е. П., Шишкина С. В., Баумер В. Н.
Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс “Институт монокристаллов” НАН Украины», Харьков, Украина

Исследование некоторых физико-химических свойств мометазона фууроата безводного и мометазона фууроата моногидрата

Исследована растворимость мометазона фууроата (МФ) безводного и МФ моногидрата в воде и смешанных растворителях, содержащих воду и 2.2 % (м/м) глицерина или воду и 5 % (м/м) пропиленгликоля (ПГ), при температуре 25 °С. Предварительно методом порошкового рентгенофазового анализа идентифицированы указанные формы МФ, а также разработана и валидирована методика количественного определения МФ в водных растворах методом жидкостной хроматографии в необходимом диапазоне применения. Установлено, что растворимость МФ безводного приблизительно в 2.3 раза выше, чем МФ моногидрата, а гликоли в низких концентрациях мало влияют на растворимость обеих кристаллических форм МФ, которая больше зависит от способа изготовления раствора/суспензии. Разная растворимость в воде МФ безводного и МФ моногидрата обусловлена их разными кристаллическими структурами, которые были уточнены по результатам рентгенофазового анализа. На основании данных расчета энергии водородных связей показано, что молекулы воды связывают молекулы МФ моногидрата в кристаллической структуре, что приводит к понижению его растворимости в воде. Структура, характерная для той или иной формы МФ, присуща субстанциям разных производителей. Методом лазерной дифракции установлено, что размер частиц и распределение их по размерам в субстанциях МФ безводного и МФ моногидрата от разных производителей существенно отличаются. Результаты исследований позволяют обосновать выбор субстанций МФ для назальных и кожных препаратов местного действия в форме спреев и кремов, а также способ изготовления суспензий.

Ключевые слова: мометазона фууроат, растворимость, жидкостная хроматография, количественное определение, лазерная дифракция, размер частиц, рентгенофазовый порошковый анализ, кристаллическая структура.

Физико-химические свойства и дисперсное состояние действующего вещества в лекарственном препарате могут влиять на функциональные характеристики препарата, эффективность терапевтического действия, биодоступность и безвредность. Чтобы препарат местного действия был эффективен и безвреден, в частности при нанесении на слизистые оболочки, может потребоваться максимально снизить проницаемость и биодоступность лекарственного вещества. Для этого его следует вводить в препарат в виде суспензии. Эффективность специфического действия суспензионного препарата должна быть тем выше, чем меньше размер частиц дисперсной фазы, а его системная токсичность — тем меньше, чем меньше доля лекарственного вещества, которое находится в виде раствора и имеет высокую способность к проницаемости в отличие от твердых суспендированных частиц [1]. Поэтому при фармацевтической разработке суспензионных препаратов местного действия необходимо исследовать размер частиц действующих веществ и их растворимость в дисперсионной среде. При этом следует учитывать такие свойства субстанции, которые могут повлиять на ее растворимость и биодоступность, например содержание воды и кристаллическая структура [2, 3].

Мометазона фууроат (МФ) — нефторированный глюкокортикостероид, который применяют наружно в форме мази и крема, а также в форме назального спрея [4, 5]. Имеются две кристаллические формы МФ: безводного

вещества (М.м. 521.4; CAS [83919-23-7]), стандартизованного в монографии «Mometasone fuuroate» Европейской Фармакопеи [6], и МФ моногидрата (М.м. 539.43; CAS [141646-00-6]) [7], не описанного в фармакопеях. Потеря в массе при высушивании МФ (безводного) нормируется не более 0.5 % [6], а содержание воды в МФ моногидрате составляет около 3.3 %. Обе формы можно легко различить с помощью метода рентгеновской дифракции, поскольку они имеют различную дифрактограмму. Кристаллы МФ безводного и моногидрата имеют различия в кристаллическом строении, которые были проанализированы в работе [7]. Однако результаты этого анализа требуют некоторых уточнений. Рентгенограммы, снятые при разных температурах, свидетельствуют, что МФ моногидрат переходит в метастабильную безводную форму после дегидратации, трансформирующуюся в стабильную безводную форму после нагревания до температуры свыше 150 °С, или быстро переходит в МФ моногидрат при температуре 23 °С и относительной влажности 45 % [7].

МФ безводный и МФ моногидрат практически нерастворимы в воде (менее 1 г в 10 000 мл при температуре от 15 °С до 25 °С) [6, 7], однако в мазях и кремах используется только МФ безводный, а в назальных спреях — только МФ моногидрат [4, 5].

Цель данной работы — исследование растворимости МФ безводного и МФ моногидрата в воде и водных растворах гликолей, а также

структуры их кристаллов и распределения частиц по размерам для обоснования их использования в разных лекарственных формах.

Объекты и методы

В качестве объектов исследований использовали микронизированные субстанции МФ безводного производства двух фирм: Symbiotec Pharmed Private Limited (далее — Symbiotec) и Shanghai Aurisco Co. Ltd (далее — Aurisco) и микронизированные субстанции МФ моногидрата производства фирм Symbiotec и Industriale Chimica S.r.l.

Растворимость МФ определяли при температуре $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ в воде очищенной и двух смешанных растворителях, один из которых состоял из 2.2 % (м/м) глицерина и 97.8 % (м/м) воды очищенной, что соответствует концентрации глицерина в дисперсионной среде препарата в форме назального спрея, а другой — из 5.0 % (м/м) пропиленгликоля (ПГ) и 95.0 % (м/м) воды очищенной [6, 8], что соответствует концентрации ПГ в дисперсионной среде разработанного нами препарата в форме крема.

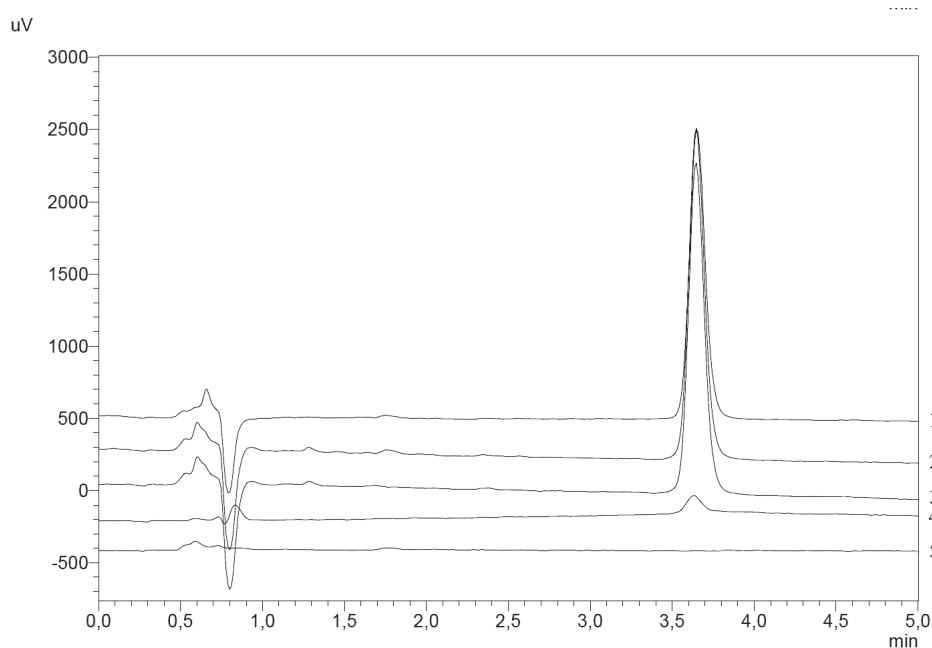
Растворимость МФ исследовали изотермическим методом [9], а концентрацию насыщенного раствора определяли методом жидкостной хроматографии [6] по разработанной нами методике. Насыщенные растворы получали двумя способами. По способу 1 избыточное количество МФ помещали в сосуды с при-

тертыми пробками, заливали растворителем соответствующего состава и термостатировали при температуре $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании до наступления термодинамического равновесия. Время насыщения составляло около 72 ч. По способу 2 сосуды термостатировали при температуре $(60.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании в течение 24 ч, затем охлаждали и термостатировали при температуре $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании до наступления термодинамического равновесия. Оба способа связаны с процессами частичного разрушения кристаллической структуры МФ при разных температурах, а способ 2 — также с кристаллизацией МФ при охлаждении.

Контроль за установлением термодинамического равновесия в системе осуществляли путем отбора проб надосадочной жидкости (раствора) и определения концентрации МФ. Постоянство содержания МФ в серии последовательно отобранных проб свидетельствовало о наступлении термодинамического равновесия в исследуемой системе. Затем растворы выдерживали 3–4 ч в состоянии покоя при температуре $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, отфильтровывали от осадка при этой же температуре и отбирали пробы для анализа.

Хроматографирование проводили в следующих условиях:

Рисунок 1



Хроматограммы испытуемых растворов МФ моногидрата (1) и МФ безводного (2), раствора сравнения (3), раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (4), смеси воды, ПГ и глицерина (5)

- прибор: хроматограф жидкостный типа Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D со спектрофотометрическим (диодноматричным) детектором;
- колонка: размером 150 мм × 4.6 мм, заполненная силикагелем для хроматографии октадецилсилильным P с размером частиц 5 мкм («Luna C18(2) 100А», фирмы Phenomenex, кат. № 00F-4252-E0);
- подвижная фаза: вода для хроматографии P – ацетонитрил для хроматографии P – (50:50);
- скорость потока: 2.0 мл/мин;
- детектирование: $\lambda = 249$ нм;
- температура колонки: 40 °С;
- объем пробы: 20 мкл.

Для методики количественного определения МФ в растворах были проведены валидационные исследования в соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи Украины [10] в соответствующем диапазоне концентраций от 0.100 мкг/мл до 0.500 мкг/мл. Для приготовления раствора сравнения и модельных смесей использовали стандартный образец мометазона фуurato Британской Фармакопеи (кат. № 768; сер. № 2875).

Времена удерживания пиков МФ безводного ($R_i = 3.639$ мин) и МФ моногидрата ($R_i = 3.645$ мин) на хроматограммах испытуемых растворов совпадают со временами удерживания пиков мометазона фуurato на хро-

мограмме раствора сравнения ($R_i = 3.633$ мин) с точностью 0.17 % и 0.33 % соответственно. На хроматограмме раствора смеси растворителей вода – ПГ – глицерин отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика МФ на хроматограмме раствора сравнения (Рис. 1). Полученные данные подтверждают специфичность методики.

Результаты определения прецизионности (сходимости), правильности и линейности методики представлены в Табл. 1 и на Рис. 2.

Методика количественного определения МФ характеризуется достаточной сходимостью (прецизионностью) в указанном диапазоне концентраций, так как найденное значение относительного доверительного интервала величины \bar{Z} составляет всего лишь 1.1668 % (Табл. 1). Это, например, меньше критического значения 1.6 % для сходимости результатов при допусках $B = \pm 5$ %. Методика также характеризуется достаточной правильностью, так как величина систематической погрешности ($\delta = 1.1138$ %) удовлетворяет требованиям критерия практической незначимости (для $B = \pm 5$ %) (Табл. 1) и статистически неотличима от нуля.

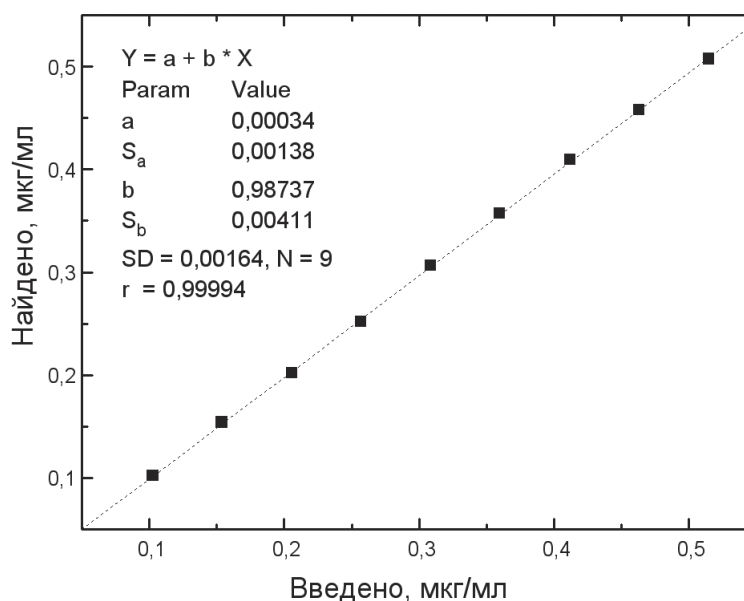
Линейность зависимости между взятой и найденной концентрацией МФ в диапазоне от 0.100 мкг/мл до 0.500 мкг/мл подтверждается высоким значением коэффициента корреляции $r = 0.99994$, а также тем фактом, что в регрессионном уравнении ($Y_i = a + b \times X_i$) свободный

Таблица 1

Результаты анализа модельных растворов, содержащих от 0.100 мкг/мл до 0.500 мкг/мл МФ, и их статистическая обработка

№ раствора	Введено: С, мкг/мл (X_i)	Найдено: С, мкг/мл (Y_i)	Найдено в % к введеному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$
1	0.103	0.102	99.03
2	0.154	0.154	100.00
3	0.206	0.202	98.06
4	0.257	0.252	98.05
5	0.309	0.306	99.03
6	0.360	0.357	99.17
7	0.412	0.409	99.27
8	0.463	0.458	98.92
9	0.515	0.507	98.45
Среднее, Z_{cp} , % =			98.89
Относительное стандартное отклонение, RSD_z , %			0.6275
Относительный доверительный интервал, Δ_z , % $\Delta\% = t(95\%, n - 1) \times RSD_z = 1.8595 \times RSD_z =$			1.1668
Оценка сходимости (для $B = 5$ %): 1.1668 % < 1.6 %			Выполняется
Систематическая погрешность, $\delta = Z_{cp} - 100 $, %			1.1138
Оценка практической незначимости систематической погрешности: $\delta < 0.32 \times 1.6\% = 0.512\% > 1.1138\%$			Выполняется
Общий вывод о методике			Корректна

Рисунок 2



Линейная зависимость найденной концентрации МФ от его введенной концентрации

член (a) не превышает свой доверительный интервал и статистически неотличим от нуля:

$$a = 0.00034 \leq t(95\%, n - 2) \times S_a = |1.8946 \times S_a| = |1.8946 \times 0.00138| = 0.00261.$$

Предел количественного определения (ПКО), рассчитанный по стандартному отклонению свободного члена a линейной регрессии, составляет:

$$\begin{aligned} \text{ПКО} &= 10 \times S_a = \\ &= 10 \times 0.00138 = 0.0138 \text{ мкг/мл.} \end{aligned}$$

При этом соотношение сигнал/шум (S/N) на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (Рис. 1), содержащего 0.026 мкг/мл МФ, составляет 24.83, что больше 10 (критерий приемлемости) [10].

Результаты валидационных исследований методики количественного определения МФ в растворах позволяют считать ее корректной в диапазоне концентраций от 0.100 мкг/мл до 0.500 мкг/мл по характеристикам «специфичность», «сходимость (прецизионность)», «правильность», «линейность» и «ПКО». Данную методику можно использовать для количественного определения растворенного МФ в воде и водно-гликолевых растворителях.

Для идентификации и сравнения субстанций МФ, а также определения их чистоты и наличия полиморфных модификаций были проведены исследования методом порошковой рентгеновской дифракции. Рентгенофазовый анализ выполнен на порошковом дифрактометре Siemens D500 в отфильтрованном медном

излучении ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$, графитовый монохроматор на вторичном пучке, геометрия Брегга - Brentano) при комнатной температуре в режиме шагового сканирования в интервале углов $2.5^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$, шаг сканирования — 0.02° . Расчет рентгенограмм образцов МФ проводили по методу Ритвельда (программа FullProf [11]).

Распределение частиц МФ по размерам определяли в суспензиях методом лазерной дифракции с помощью лазерного дифракционного анализатора частиц Shimadzu SALD-2201 [6]. В качестве дисперсионной среды суспензий использовали воду очищенную, в которой МФ практически нерастворим, а в качестве смачивателя — полисорбат 80 [6]. Для изготовления испытуемой суспензии 2.0 г полисорбата 80 растворяли в 100 г воды очищенной (раствор А). В стакан вместимостью 50 мл отвешивали 100 мг субстанции МФ и прибавляли 20 мл раствора А. Стакан помещали на ультразвуковую баню типа УЗМ (мощностью 250 ВА) и суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при температуре 20-25 °С для разрушения агрегатов частиц. 1 мл полученной суспензии помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили раствором А до метки и перемешивали (0.1 мг/мл МФ).

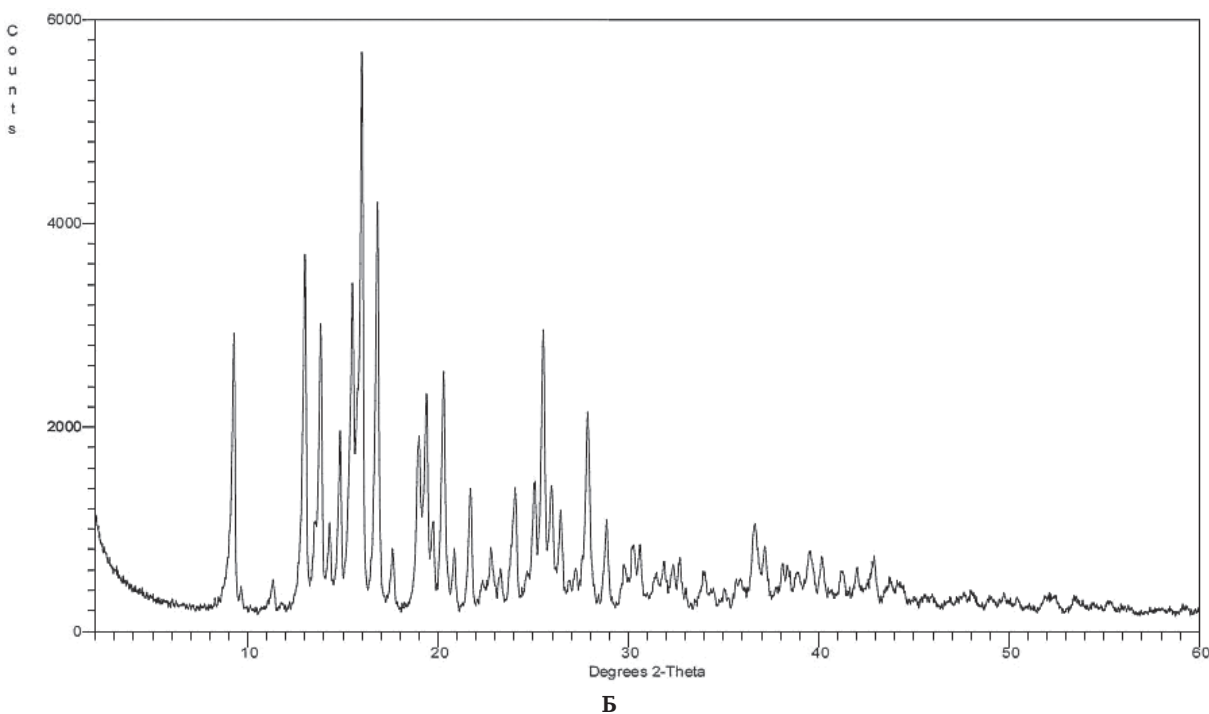
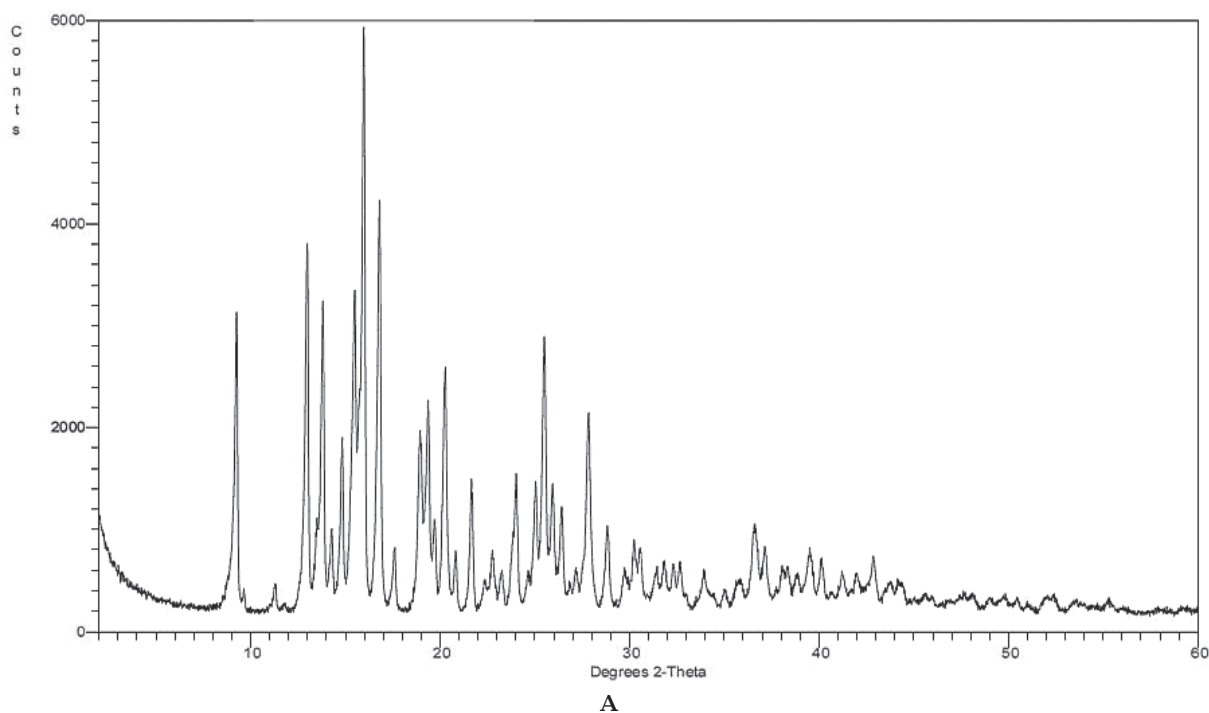
Результаты исследований и их обсуждение

Поиск в Cambridge Structural Database (Version 5.38, update February 2017) [19] показал, что для МФ известны структуры МФ безводного (CCDC = SEGXAE, $a = 12.341 \text{ \AA}$, $b = 13.584 \text{ \AA}$, $c = 14.938 \text{ \AA}$, пространственная группа $P2_12_12_1$)

и моногидрата (CCDC = SEGXEI, $a = 7.321 \text{ \AA}$, $b = 8.477 \text{ \AA}$, $c = 11.814 \text{ \AA}$, $\alpha = 73.25^\circ$, $\beta = 85.01^\circ$, $\gamma = 69.34^\circ$, пространственная группа P1), сведений о полиморфных модификациях нет. На Рис. 3 представлены рентгенограммы, полученные для образцов МФ безводного, а на Рис. 4 — для образцов МФ моногидрата.

Как следует из Рис. 3, рентгенограммы обоих образцов МФ безводного разных производителей идентичны. Расчет рентгенограммы образца МФ безводного фирмы Symbiotec по методу Ритвельда (программа FullProf [11], инструментальная функция профиля линий найдена по рентгенограмме гексаборида лантана

Рисунок 3



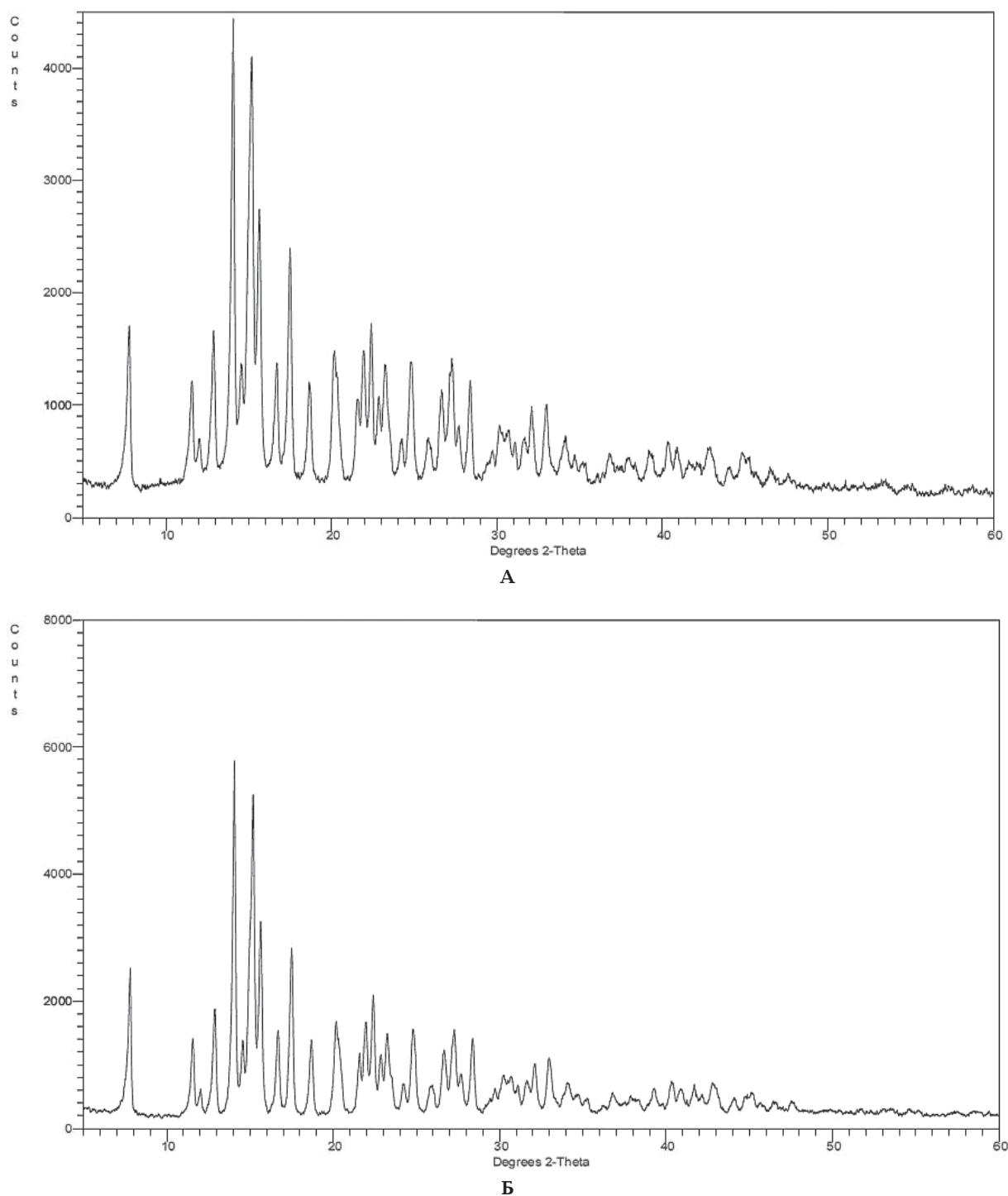
Рентгенограммы образцов МФ безводного фирмы Symbiotec (А) и фирмы Aurisco (Б)

LaB₆, снятой в аналогичных условиях) показал (см. Рис. 5), что образец является безводным МФ (пространственная группа P2₁2₁2₁, a = 12.344 Å, b = 13.583 Å, c = 14.928 Å) и не содержит посторонних примесей, искажающих его характерную рентгенограмму.

Таким образом, оба образца субстанций, рентгенограммы которых представлены на Рис. 3, имеют характерную структуру МФ безводного.

Как следует из Рис. 4, рентгенограммы обоих образцов МФ моногидрата, произведенных

Рисунок 4



Рентгенограммы образцов МФ моногидрата фирмы Symbiotec (А) и фирмы Industriale Chimica S.r.l. (Б)

разными фирмами, идентичны; они отличаются от рентгенограмм МФ безводного (Рис. 3).

Расчет рентгенограммы образца МФ моногидрата фирмы Symbiotec по методу Ритвельда (программа FullProf [11], инструментальная функция профиля линий найдена по рентгенограмме гексаборида лантана LaB_6 , снятой в аналогичных условиях) показал (см. Рис. 6), что образец является моногидратом МФ (пространственная группа $R\bar{1}$, $a = 7.312 \text{ \AA}$, $b = 8.470 \text{ \AA}$, $c = 11.804 \text{ \AA}$, $\alpha = 73.21^\circ$, $\beta = 84.98^\circ$, $\gamma = 69.34^\circ$) и не содержит посторонних примесей, искажающих его характерную рентгенограмму.

Таким образом, оба образца субстанций, рентгенограммы которых представлены на Рис. 4, имеют характерную структуру МФ моногидрата.

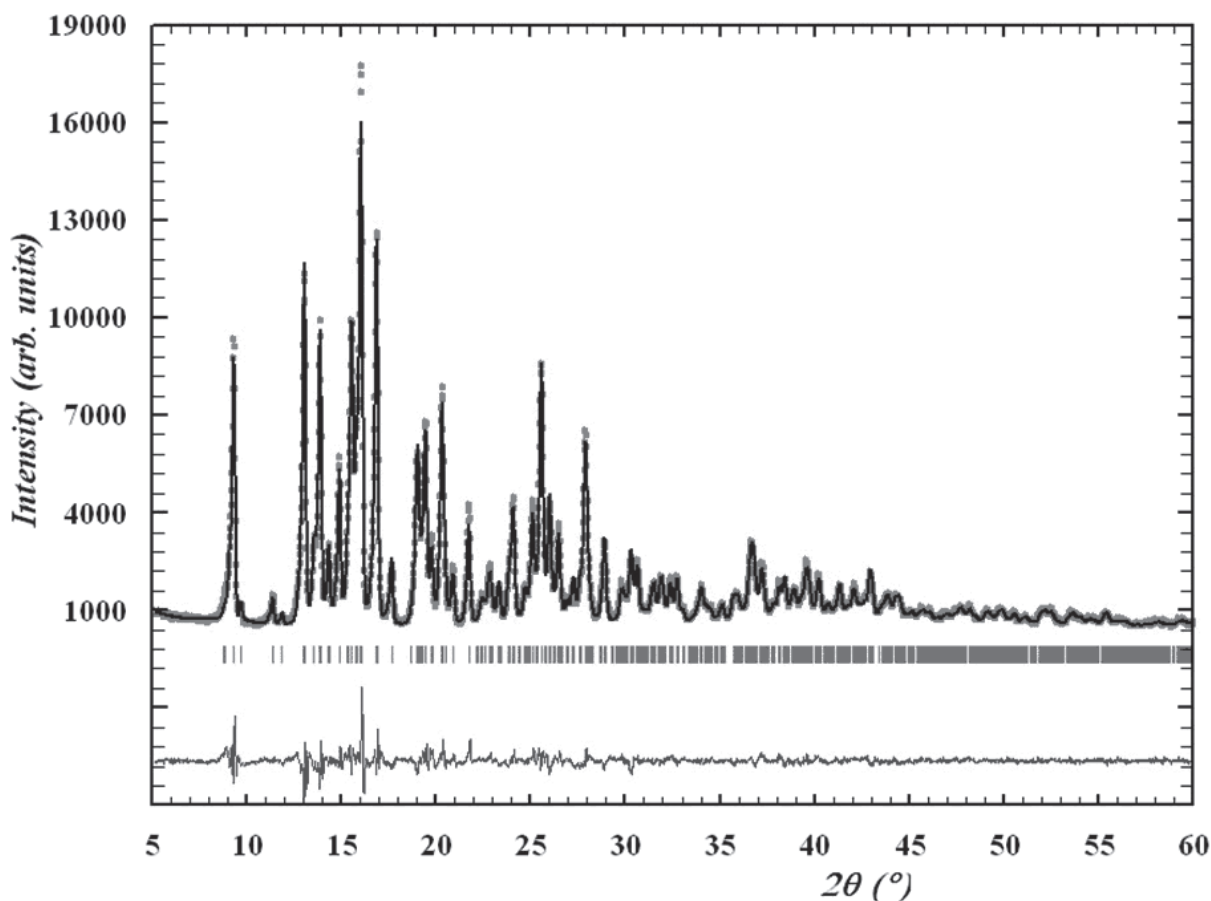
На Рис. 7 и в Табл. 2 представлена информация о распределении частиц по размерам в двух субстанциях МФ безводного, а на Рис. 8

и в Табл. 3 — в двух субстанциях МФ моногидрата.

Как следует из Рис. 7 и Табл. 2, МФ безводный производства фирмы Symbiotec характеризуется меньшим размером частиц и более узким диапазоном их распределения по размерам. Если в образце № 1 средний медианный диаметр частиц МФ безводного составил 2.061 мкм, то в образце № 2 он оказался в 1.63 раза больше (3.351 мкм). Максимальный размер для 90 % частиц в образце № 1 составил 4.424 мкм, а в образце № 2 — 11.318 мкм, что больше в 2.56 раза. В образце № 1 99.695 % частиц имеют размер менее 10.231 мкм, тогда как в образце № 2 размер менее 10.231 мкм имеют лишь 88.179 % частиц.

Как следует из Рис. 8 и Табл. 3, МФ моногидрат производства фирмы Symbiotec также характеризуется меньшим размером частиц и более узким диапазоном их распределения по размерам. Если в образце № 1 средний ме-

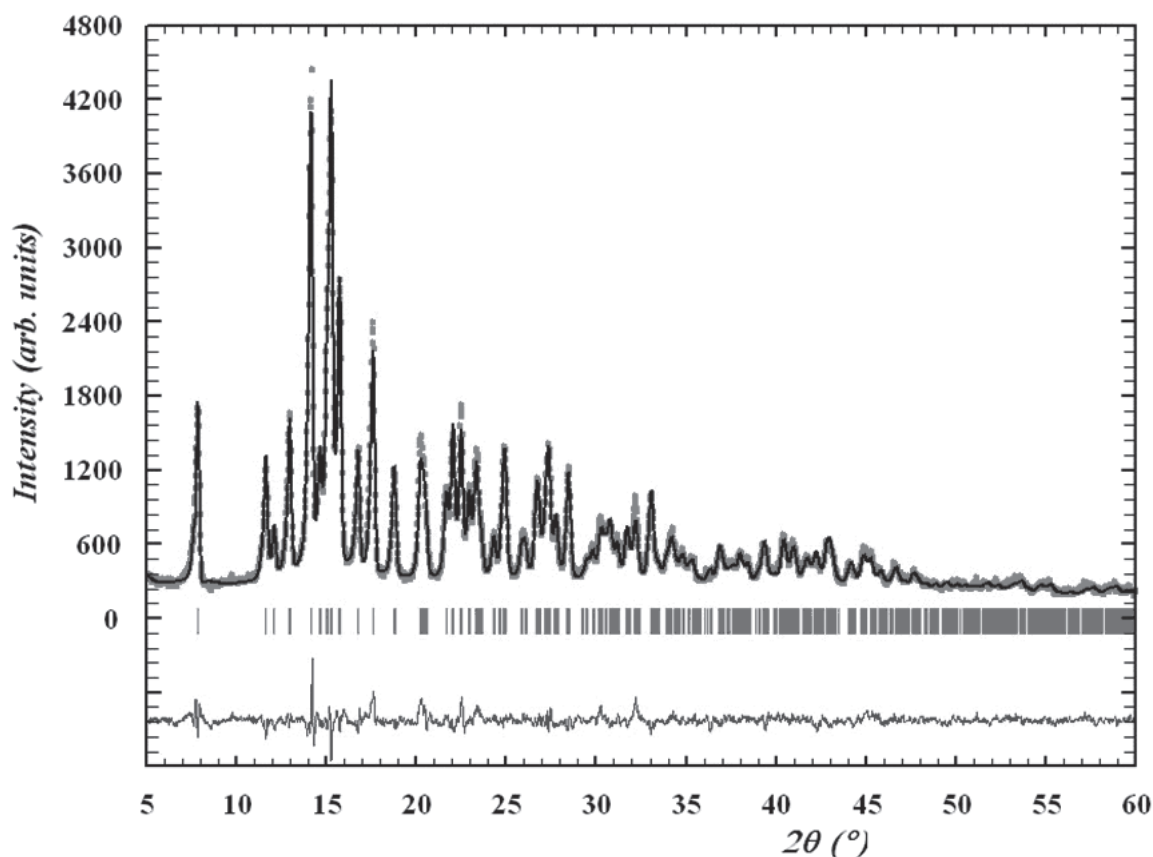
Рисунок 5



Результаты уточнения рентгенограммы МФ безводного фирмы Symbiotec по методу Ритвельда

Примечание. Приведены наложенные друг на друга рентгенограммы, полученные экспериментально и вычислением; ряд вертикальных штрихов показывают положения дифракционных максимумов; разница между экспериментальными и вычисленными значениями интенсивности в каждой точке показана на нижней кривой.

Рисунок 6



Результаты уточнения рентгенограммы МФ моногидрата фирмы Symbiotec по методу Ритвельда

Примечание. Приведены наложенные друг на друга рентгенограммы, полученные экспериментально и вычислением; ряд вертикальных штрихов показывает положения дифракционных максимумов; разница между экспериментальными и вычисленными значениями интенсивности в каждой точке показана на нижней кривой.

дианный диаметр частиц МФ моногидрата составил 2.940 мкм, то в образце № 2 он оказался в 1.78 раза больше (5.247 мкм). Максимальный размер для 90 % частиц в образце № 1 составил 8.109 мкм, а в образце № 2 — 17.530 мкм, что

больше в 2.16 раза. В образце № 1 94.301 % частиц имеют размер менее 10.231 мкм, тогда как в образце № 2 размер менее 10.231 мкм имеют лишь 76.262 % частиц.

Таблица 2

Максимальный размер частиц (D) МФ безводного производства фирм Symbiotec (1) и Augisco (2) в разных фракциях, содержащих от 10 % до 90 % частиц от их общего числа в анализируемом образце суспензии

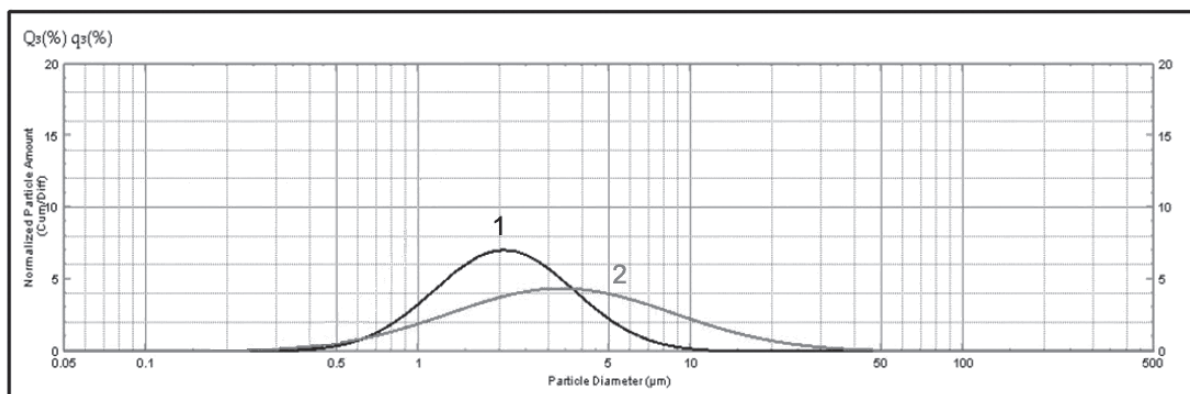
МФ	D (мкм) во фракциях, содержащих долю от общего числа частиц (%):								
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
1	0.966	1.258	1.508	1.771	2.061	2.392	2.817	3.400	4.424
2	1.000	1.509	2.041	2.635	3.351	4.261	5.513	7.443	11.318

Таблица 3

Максимальный размер частиц (D) МФ моногидрата производства фирм Symbiotec (1) и Industriale Chimica S.r.l. (2) в разных фракциях, содержащих от 10 % до 90 % частиц от их общего числа в суспензии

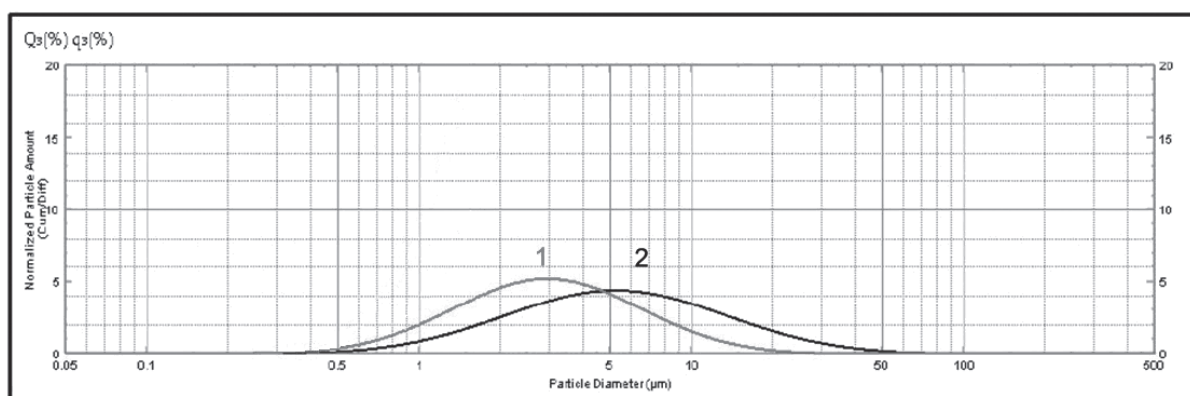
МФ	D (мкм) во фракциях, содержащих долю от общего числа частиц (%):								
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
1	1.061	1.507	1.941	2.404	2.940	3.599	4.468	5.751	8.109
2	1.584	2.379	3.211	4.137	5.247	6.657	8.594	11.582	17.530

Рисунок 7



Распределение частиц по размерам в микронизированных субстанциях МФ безводного фирм Symbiotec (1) и Aurisco (2)

Рисунок 8



Распределение частиц по размерам в микронизированных субстанциях МФ моногидрата фирм Symbiotec (1) и Industriale Chimica S.r.l. (2)

Таким образом, несмотря на идентичность структуры кристаллов субстанций МФ безводного или МФ моногидрата разных производителей, они отличаются по степени микронизации. Чем меньше размер суспендированных частиц, тем больше поверхность раздела между твердой дисперсной фазой и жидкой или мягкой дисперсионной средой, тем потенциально эффективнее может быть терапевтическое действие препаратов для местного применения в

форме суспензионных мазей, кремов и спреев. Поэтому для исследования растворимости были выбраны субстанции МФ безводного и МФ моногидрата производства фирмы Symbiotec. В Табл. 4 представлены результаты исследования растворимости МФ безводного и МФ моногидрата.

МФ безводный и МФ моногидрат практически нерастворимы в воде, однако, как следует из Табл. 4, концентрация МФ в водном раство-

Таблица 4

Растворимость МФ безводного (1) и МФ моногидрата (2) в воде и смешанных растворителях

МФ	Состав растворителя, % (м/м)	Температура растворения	Концентрация (С) МФ, мкг/мл	C ₁ : C ₂
1	Вода очищенная	25 °С	0.439	2.35
2			0.187	
1	2.2 % глицерина в воде очищенной	25 °С	0.407	2.15
2			0.188	
1	5.0 % ПГ в воде очищенной	25 °С	0.443	2.33
2			0.190	
1	5.0 % ПГ в воде очищенной	60 °С → 25 °С	0.229	2.25
2			0.102	

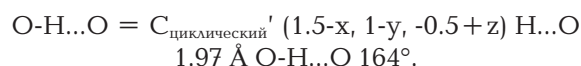
ре оказывается приблизительно в 2.3 раза выше в случае растворения МФ безводного. Учитывая сильную физиологическую активность МФ, разная растворимость разных кристаллических форм МФ может быть значимой для их выбора в качестве активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) для препаратов в разных лекарственных формах с разными путями введения.

Небольшое содержание в составе смешанных растворителей гликолей (2.2 % (м/м) глицерина или 5.0 % (м/м) ПГ) существенно не влияет на растворимость как МФ безводного, так и МФ моногидрата (Табл. 4). Это, видимо, обусловлено тем фактом, что при низких концентрациях гликолей в смешанных растворителях превалирует структура воды, которая и определяет растворимость МФ [9, 12].

Известно, что растворимость вещества определяется сольватирующей способностью растворителя и энергией кристаллической решетки [16]. Так как различия в растворимости МФ безводного и МФ моногидрата практически не зависят от использованных растворителей

(Табл. 4), то можно утверждать, что различия в растворимости определяются особенностями кристаллической структуры и энергией кристаллической решетки этих двух форм МФ. Ранее в работе [7] была показана существенная разница в плотности кристаллов МФ безводного (1.383 г/см³) и МФ моногидрата (1.364 г/см³). Можно было бы ожидать, что кристаллы МФ моногидрата с меньшей плотностью будут быстрее и лучше растворяться. Прямо противоположные результаты исследований растворимости МФ безводного и МФ моногидрата (Табл. 4) вызвали вопрос о роли молекул воды в кристаллической структуре МФ моногидрата и их влиянии на растворимость.

Более тщательное исследование строения кристаллов МФ безводного и МФ моногидрата показало существенное различие их кристаллической структуры. В кристаллах МФ безводного его молекулы образуют зигзагообразные цепочки (Рис. 9А) вдоль кристаллографического направления [001] за счет межмолекулярной водородной связи между гидроксильной группой и карбонильной группой у 3-го атома углерода (в кольце А):



Каждая молекула МФ образует две такие водородные связи, энергия каждой из которых, оцененная в рамках теории Bader R. «Атомы в молекулах» [17] с использованием уравнения Espinosa E. [18], составляет 5.1 ккал/моль. Соответственно, суммарная энергия водородного связывания между указанными функциональными группами каждой молекулы МФ и двух других молекул МФ в цепочке составляет 10.2 ккал/моль.

Внедрение в кристаллическую структуру гидратных молекул воды приводит к разрыву водородных связей между указанными функциональными группами молекул МФ. Все молекулы МФ в кристаллах МФ моногидрата связаны между собой исключительно через мостиковые молекулы воды (Рис. 9Б) и образуют слои, параллельные кристаллографической плоскости (110). Каждая из молекул МФ образует три межмолекулярные водородные связи с тремя разными молекулами воды (между карбонильной группой у 3-го атома углерода в кольце А, гидроксильной группой у 11-го атома углерода в кольце С и карбонильной группой сложноэфирного фрагмента):

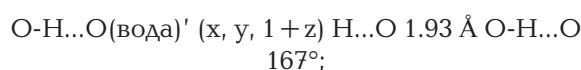
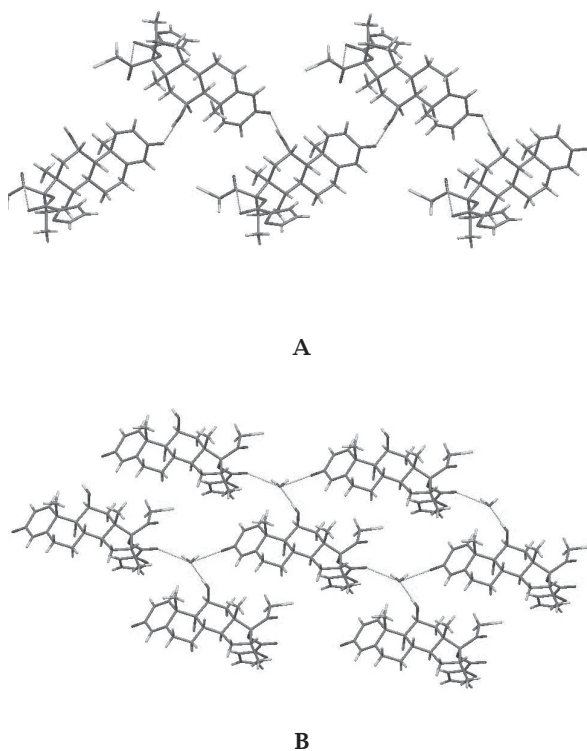


Рисунок 9



Основной структурный мотив кристаллической упаковки МФ безводного (А) и МФ моногидрата (Б)

Примечание. Водородные связи показаны линиями, соединяющими молекулы МФ на Рис. 9А, и линиями, соединяющими молекулы воды и МФ на Рис. 9Б.

$O(\text{вода})-H...O = C_{\text{циклический}}' (1+x, y-1, z-1) H...O$
 $2.00 \text{ \AA } O-H...O 152^\circ;$

$O(\text{вода})-H...O = C_{\text{сложноэфирный}}' (x, y, z) H...O 2.13$
 $\text{ \AA } O-H...O 154^\circ.$

Энергии этих водородных связей составляют 6.47 ккал/моль, 5.48 ккал/моль и 4.08 ккал/моль соответственно. Следовательно, суммарная энергия водородного связывания между указанными функциональными группами каждой молекулы МФ с соседними молекулами воды в слое составляет 16.03 ккал/моль. Таким образом, можно утверждать, что молекулы воды играют не разрыхляющую, а связывающую роль в кристаллической структуре МФ моногидрата, что приводит к понижению растворимости.

Функциональное назначение гликолей, введенных в низких концентрациях (см. Табл. 4) в составы препаратов МФ для местного применения, может быть связано со способом изготовления препарата. То есть, гликоли могут применяться для смачивания порошка, предварительного изготовления концентрированной суспензии или раствора с последующим введением суспензии или раствора в основу и гомогенизацией дисперсной системы (однородным распределением МФ в дисперсной системе). При этом необходимо учитывать цель способа изготовления и растворимость МФ в гликоле при данной температуре или в зависимости от температуры. Растворимость МФ возрастает с повышением концентрации гликоля в смешанном растворителе вода – гликоль, с увеличением температуры [9] и с уменьшением гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) гликоля. Так, растворимость МФ безводного увеличивается в ряду глицерин < ПГ < гексиленгликоль [12]. При температуре 25 °С в глицерине (ГЛБ = 11.275) МФ безводный практически нерастворим, в ПГ (ГЛБ = 9.375) растворяется около 0.24 % (м/м) МФ безводного, а в гексиленгликоле (ГЛБ = 7.950) — 1.4 % (м/м) [13] (примечание: расчет ГЛБ проводили по методу Davies [14]). Кроме того, функциональное назначение гликоля может быть связано с потенцированием специфического действия глюкокортикостероида за счет усиления связывания его молекул с соответствующими рецепторами [15].

Растворимость МФ в воде и смешанных растворителях гликоль – вода увеличивается с повышением температуры [9]. Вследствие этого при температуре 60 °С МФ растворяется в несколько раз больше, чем при температуре 25 °С [9]. При охлаждении раствора, имеющего тем-

пературу 60 °С, до температуры 25 °С происходит кристаллизация части растворенного МФ. Как следует из Табл. 4, концентрации МФ безводного и МФ моногидрата, которые остаются в растворенном состоянии, оказываются приблизительно в 1.9 раза меньше по сравнению с соответствующими растворами, полученными при температуре 25 °С без нагревания. То есть, в процессе изогидричной кристаллизации можно получить суспензию с меньшим содержанием МФ в растворенном состоянии. При этом концентрация МФ моногидрата в растворе все равно оказывается в 2.25 раза меньше, чем концентрация растворенного МФ безводного.

Результаты исследований явились частью фармацевтической разработки препаратов с МФ безводным в форме кремов на основе эмульсий 1-го и 2-го рода для кожного применения и в форме назальных спреев.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения МФ в растворах в диапазоне концентраций от 0.100 мкг/мл до 0.500 мкг/мл методом жидкостной хроматографии, корректность которой подтверждена результатами валидационных исследований.

2. Методом порошкового рентгенофазового анализа идентифицированы кристаллические формы образцов МФ безводного и МФ моногидрата, которые были использованы для сравнительных исследований. Показано, что МФ безводный и МФ моногидрат имеют характерные для каждой из этих субстанций кристаллические структуры, которые были уточнены по результатам рентгенофазового анализа. Характерная структура, присущая той или иной форме МФ, проявляется для субстанций, произведенных разными фирмами. Указанные субстанции не содержат посторонних примесей, искажающих их характерные кристаллические структуры.

3. Методом лазерной дифракции исследовано распределение частиц по размерам в микронизированных субстанциях МФ безводного и МФ моногидрата и установлено, что по параметрам, характеризующим степень микронизации, субстанции разных производителей отличаются друг от друга. По результатам исследований для разработки препаратов выбраны субстанции МФ безводного и МФ моногидрата производства фирмы Symbiotec Pharmed Private Limited, которые характеризуются меньшим размером частиц и более узким распределением их по размерам.

4. Исследована растворимость МФ безводного и МФ моногидрата в воде и смешанных растворителях 2.2 % глицерина – вода и 5.0 % ПГ – вода при температуре 25 °С. Установлено, что концентрация МФ в водном растворе оказывается приблизительно в 2.3 раза больше в случае растворения МФ безводного, что обусловлено отличиями в структуре и энергии кристаллической решетки этих двух форм МФ. Наличие в составе растворителя небольших концентраций гликолей существенно не влияет на растворимость как МФ безводного, так и МФ моногидрата, что, видимо, обусловлено преобладанием в таких смешанных растворителях структуры воды. В процессе изогидричной кристаллизации можно получать суспензии с меньшим содержанием МФ в растворенном состоянии по сравнению с соответствующими суспензиями, полученными при температуре 25 °С без нагревания.

5. Результаты исследований использованы при обосновании выбора субстанции МФ моногидрата для спрея назального и субстанции МФ безводного для мази и кремов на основе эмульсий 1-го и 2-го рода, а также для способов изготовления и введения суспензий МФ в основы препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ляпунов А.Н. Исследование высвобождения мелоксикама из мягких лекарственных средств в опытах *in vitro* методом диализа через полупроницаемую мембрану / Ляпунов А.Н., Безуглая Е.П., Ляпунов Н.А. // Фармаком. – 2016. – № 2. – С. 33-42.
2. EMEA/CHMP/167068/2004 – ICH. – Part I. – ICH Topic Q 8 (R2). – Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development, 2009.
3. CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev. 1 / Corr **. – Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London 20 January 2010.
4. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. Sweetman S.C. – London: Pharmaceutical Press, 2009. – 3694 p.
5. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.drz.kiev.ua/>.
6. European Pharmacopoeia. 9th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. – 4016 p.
7. Solid State Characterization of Mometasone Furoate Anhydrous and Monohydrate Forms / Xiaoming (Sean) Chen, Matthew Carillo, R. Curtis Haltiwanger, Prudence Bradley // J. Pharm. Sci. – 2005. – V. 94. – P. 2496-2509.
8. Pharmaceutical Excipients / Eds. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen. – Pharmaceutical Press, London, 2006 (Electronic version).
9. Растворимость мометазона фуората в смешанном растворителе вода – гексилглицерин / Красноперова А.П., Юхно Г.Д., Ляпунова А.Н. и др. // Вісник Харківського національного університету. Хімія. – 2011. – № 976. Вип. 20 (43). – С. 147-155.
10. 5.3.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 910-929.
11. Rodriguez-Carvajal J., Roisnel T. FullProf.98 and WinPLOTR: New Windows 95/NT Applications for Diffraction. Commission for Powder Diffraction, International Union of Crystallography, Newsletter No.20 (May-August). Summer 1998.
12. Безуглая Е.П. Исследование системы вода – гексилглицерин как возможной основы лекарственных форм / Безуглая Е.П., Ляпунова А.Н., Красноперова А.П. // Хим.-фарм. журн. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 49-54.
13. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов. Глава 9 / Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Столпер Ю.М. и др. // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств (в 3 т.) / Под ред. В.П. Георгиевского. – Т. 3: Метрологическое и нормативное обеспечение создания, производства и контроля качества лекарственных средств. – Харьков: НТМТ, 2011. – Т. 3. – С. 1419-1512.
14. Гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) и методы его определения / Башура Г.С., Ляпунов Н.А., Дильбарханов Р.Д. и др. // Изв. АН КазССР. Сер. Биол. – 1977. – № 5. – С. 74-80.
15. Голиков П.П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта. – М.: Медицина, 1988. – 288 с.
16. Мелвин-Хьюз Э.А. Физическая химия / пер. с англ., под общей ред. Я.И. Герасимова. – Изд-во Ин. лит., 1962. – Кн. 1. – 520 с. – Кн. 2. – 1148 с.
17. Bader R.F.W. Atoms in Molecules. A quantum Theory. – Clarendon Press: Oxford, U.K., 1990. – 438 p.
18. Espinosa E. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities / Espinosa E., Molins E., Lecomte C. // Chemical Phys. Letters. – 1998. – V. 285, Issues 3-4. – P. 170-173.
19. Groom C.R., Bruno I.J., Lightfoot M.P. & Ward S.C. // Acta Cryst. – 2016. – B72. – P. 171-179.

УДК 615.357.011.5

Резюме

Ляпунова А. М., Безугла О. П., Шишкіна С. В., Баумер В. М.

Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс "Інститут монокристалів" НАН України», Харків, Україна

Дослідження деяких фізико-хімічних властивостей мометазону фуорату безводного та мометазону фуорату моногідрату

Досліджено розчинність мометазону фуорату (МФ) безводного та МФ моногідрату у воді та змішаних розчинниках, що містять воду і 2.2 % (м/м) гліцерину або воду і 5 % (м/м) пропіленгліколю (ПГ), при температурі 25 °С. Перед тим методом порошкового рентгенофазового аналізу ідентифіковано зазначені форми МФ, а також розроблено та валідовано методику кількісного визначення МФ у водних розчинах методом рідинної хроматографії в необхідному діапазоні застосування. Встановлено, що розчинність МФ безводного приблизно в 2.3 рази вища за розчинність МФ моногідрату, а гліколі в низьких концентраціях мало впливають на розчинність обох кристалічних форм МФ, що більше залежить від способу виготовлення розчину/суспензії. Різна розчинність у воді МФ безводного і МФ моногідрату обумовлена їхніми різними кристалічними структурами, що були уточнені за результатами рентгенофазового аналізу. На підставі даних розрахунку енергії водневих зв'язків показано, що молекули води зв'язують молекули МФ моногідрату в кристалічній структурі, що призводить до зниження його розчинності у воді. Структура, що характерна для тієї чи іншої форми МФ, притаманна субстанціям різних виробників. Методом лазерної дифракції встановлено, що розмір частинок та їх розподіл за розмірами в субстанціях МФ безводного та МФ моногідрату від різних виробників

суттєво відрізняються. Результати досліджень дозволяють обґрунтувати вибір субстанцій МФ для назальних і нашкірних препаратів місцевої дії у формі спреїв і кремів, а також спосіб виготовлення суспензій.

Ключові слова: мометазону фуроат, розчинність, рідина хроматографія, кількісне визначення, лазерна дифракція, розмір частинок, рентгенофазовий порошковий аналіз, кристалічна структура.

UDC 615.357.011.5

Summary

Lyapunova A. M., Bezuglaya O. P., Shishkina S. V., Baumer V. M.

State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

Investigation of some physical and chemical properties of mometasone furoate anhydrous and mometasone furoate monohydrate

The solubility of mometasone furoate (MF) anhydrous and MF monohydrate in water and mixed solvents containing water and glycerol (2.2 % w/w) or water and propylene glycol (5 % w/w) was investigated at a temperature of 25 °C. Preliminary these forms of MF were identified by X-ray powder analysis as well as HPLC procedure for assay of MF in aqueous solutions was developed and validated in the necessary range of application. It was found that the solubility of MF anhydrous is approximately 2.3 times higher than the solubility of MF monohydrate. Glycols in small concentrations have little effect on the solubility of both crystalline forms of MF; apparently it is due to the predominance of water structure in these mixed solvents. The different solubility of MF anhydrous and MF monohydrate in water are due to their different crystalline forms, which were refined by the results of X-ray phase analysis. In crystals of the anhydrous MF, its molecules form zigzag chains along the crystallographic direction [001] due to the intermolecular hydrogen bond between the hydroxyl group and the carbonyl group at the 3rd carbon atom. Based on the calculation data of the energy of hydrogen bonds it was shown, that the total energy of hydrogen bonding of each molecule of MF with neighboring molecules of MF is 10.2 kcal/mol. The introduction of hydrate molecules of water into the crystal structure leads to the destruction of hydrogen bonds between MF molecules; all MF molecules in crystals of MF monohydrate bind to each other exclusively through bridging water molecules, forming layers, which are parallel to the crystallographic plane [110]. Each of the MF molecules forms three intermolecular hydrogen bonds with three different water molecules: between the carbonyl group at the 3rd carbon atom, the hydroxyl group at the 11th carbon atom and the carbonyl group of the ester fragment; the total energy of hydrogen bonding of each MF molecule is 16.03 kcal/mol. Water molecules play a binding role in the crystalline structure of the MF monohydrate; it leads to a decrease in its solubility in water.

The structure that is characteristic of each form of MF is inherent in the substances from various manufacturers. It was found by the method of laser diffraction that the particle size and particle size distribution for the substances of the MF anhydrous and MF monohydrate from various manufacturers differ significantly. In aqueous suspensions of MF, the MF fraction in the form of a solution depends on the method of the suspension production and this fraction is greater in the case of isothermal mixing and less in the case of isohydric crystallization. Glycols with a low hydrophilic-lipophilic balance (HLB), for example, hexylene glycol, can be used to obtain suspensions of MF by crystallization with the replacement of a solvent. The results of these studies allow us to justify the choice of MF substances for nasal and topical (cutaneous) preparations of local action, as well as the method of suspension production.

Keywords: mometasone furoate, solubility, liquid chromatography, assay, laser diffraction, particle size, X-ray powder analysis, crystalline structure.

Ляпунова Анна Николаевна. Окончила Национальный фармацевтический университет (2004). Мл. науч. сотр. Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

Безуглая Елена Петровна. Окончила Харьковский фармацевтический институт (1990). К. фарм. н. (1996), ст. науч. сотр. (2000). Зав. лабораторией технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2017).

Шишкина Светлана Валентиновна. Окончила Харьковский государственный университет (1993). К. х. н. (2010). Зав. отделом рентгеноструктурных исследований и квантовой химии Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2014).

Баумер Вячеслав Николаевич. Окончил Харьковский государственный университет (1972). К. х. н. (1994), ст. науч. сотр. (2000). Ст. науч. сотр. отдела рентгеноструктурных исследований и квантовой химии Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (1996).

Назарова О. С., Вербова Ю. М., Алмакаєва Л. Г., Бєгунова Н. В., Доля В. Г.
Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»
Національний фармацевтичний університет

Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки комбінованого оригінального препарату в формі розчину для інфузій для лікування критичних станів різної етіології

Представлено відповідно до вимог ДФУ аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки основних показників якості комбінованого оригінального препарату в формі розчину для інфузій для лікування критичних станів різної етіології. Розроблено, стандартизовано та проведено валідацію методики ідентифікації та кількісного визначення сукцинат-іона та аргінін-іона в готовій лікарській формі з використанням методу рідинної хроматографії. Проведені валідаційні дослідження для тесту «Кількісне визначення» сукцинат-іона та аргінін-іона підтверджують відповідність критеріям прийнятності таких валідаційних характеристик, як прогноз повної невизначеності аналізу, специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність. Розроблено методику кількісного визначення натрій- та калій-іонів з використанням методу атомно-абсорбційної спектроскопії, магній-іона — методом комплексонометричного титрування та хлорид-іона — методом аргентометричного титрування. Представлено методику для визначення супровідних домішок (речовин, виявлених нітгідринном) із використанням методу тонкошарової хроматографії.

Ключові слова: аргінін, кислота бурштинова, фармацевтична розробка, метод рідинної хроматографії, метод атомно-абсорбційної спектроскопії, стандартизація, валідація, розчин для інфузій.

Актуальність проблеми лікування критичних станів обумовлена неухильно зростаючою захворюваністю населення внаслідок низки причин, що мають як фізіологічні, так і соціальні корені. У неврологічній клініці, в клініці внутрішніх хвороб (незалежно від характеру основного захворювання), у надзвичайних ситуаціях (катастрофах, озброєних конфліктах тощо) виникає значна кількість станів, що загрожують життю людини.

Аналіз сучасного стану інфузійної терапії приводить до висновку, що ця терапія широко застосовується в медицині невідкладних станів. Основними її завданнями є поліпшення мікроциркуляції, корекція водно-електролітного балансу і кислотно-лужного стану, детоксикація, корекція порушень реологічних і коагуляційних властивостей крові, поліпшення транспорту діючої речовини до ураженого органу або ділянки організму [1].

За останні 10 років значно розширився асортимент інфузійних засобів для терапії зазначених порушень, особливо в розвинених країнах. Розроблені й нові вітчизняні інфузійно-трансфузійні препарати поліфункціональної дії на основі багатоатомних спиртів, електролітів і залужнюючих засобів. Однак, якщо порівнювати середньостатистичне використання інфузійних розчинів на душу населення в Україні та у розвинених країнах світу, то цей показник в нашій країні в 1.5-2 рази менше, що можна вважати вагомим показником недостатньої ефективності лікування багатьох патологічних станів [1, 2-13].

Враховуючи багатофакторну етіологію й патогенез критичних станів організму людини,

зважаючи на основні патологічні процеси, що виникають при цьому, а саме: гіпоксію, інтоксикацію, імуносупресію, на ліквідацію яких і планувалося спрямовування дії нового інфузійного засобу [14], нами запропоновано для підвищення ефективності й розширення спектра специфічної активності відомих раніше препаратів такої дії застосовувати бурштинову кислоту у вигляді солі з аргініном, що підвищить біодоступність препарату і розширить спектр терапевтичної дії за рахунок фармакологічного впливу цих аніонів. Також для більшої фармакологічної ефективності пропонується комбінація було досліджено можливість використання органічних солей магнію, що також підвищує біодоступність засобу і розширює спектр фармакологічної дії за рахунок терапевтичного поведінки самих кислот. До складу препарату також введено компоненти, які забезпечили відповідність його іонного складу та теоретичну осмолярність цим показникам для плазми крові, тобто збалансованість розчину, — це натрію та калію хлориди.

Створення нового ефективного вітчизняного інфузійного препарату для лікування важких станів (зокрема й для ургентного використання) робить актуальним проведення аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки цієї лікарської форми.

Метою нашої роботи є створення аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки і стандартизація методик контролю якості за основними показниками відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) до лікарських препаратів для парентерального за-

стосування (розчинів для інфузій) для розробки комбінованого оригінального препарату для лікування критичних станів різної етіології.

Результати дослідження та їх обговорення

Як об'єкти дослідження вивчали магнію сукцинат, сукцинат діаргініну, натрію хлорид, калію хлорид і препарат з цими активними фармацевтичними інгредієнтами (АФІ) у формі розчину для інфузій.

Магнію сукцинат та діаргініну сукцинат отримували безпосередньо під час технологічного процесу на стадії приготування розчину. Вихідні субстанції аргініну, натрію хлориду і калію хлориду описані в Європейській Фармакопеї (ЄФ) [15] і ДФУ [16] і контролюються відповідно до аналітичної нормативної документації (АНД) вхідного контролю, яка складена за вимогами ЄФ і ДФУ. Кислота бурштинова не описана в фармакопеях і контролюється відповідно до специфікації, яка складена відповідно до вимог виробника. Лікарські форми, які б містили комбінацію цих АФІ, не описані в жодній з фармакопей.

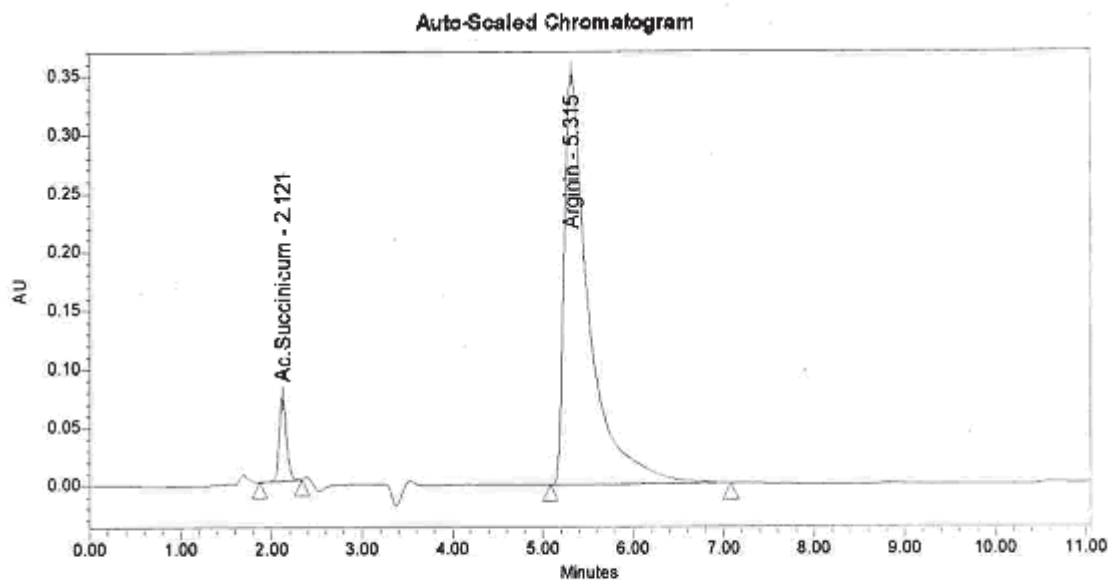
Як стандарти використовували: стандартний зразок (СЗ) аргініну (фірми SHANGHAI SYNNAD

FINE CHEMICAL CO.LTD., Китай), СЗ кислоти бурштинової (фірми SHANGHAI SYNNAD CHEMICAL CO.LTD., Китай), ФСЗ ДФУ аргініну, ФСЗ ДФУ кислоти аспарагінової, розчин натрію (ДФУ, 2.2.23, N) з концентрацією іонів натрію 200 мкг/мл, розчин калію (ДФУ, 2.2.23, N) з концентрацією іонів калію 600 мкг/мл.

Аналітичні дослідження проводили методом рідинної хроматографії (РХ) (ДФУ, 2.2.29, 2.2.46) на хроматографі фірми Waters 2487 (США) (визначення сукцинат-іона та аргінін-іона); методом атомно-абсорбційної спектроскопії (ДФУ, 2.2.23) на атомно-абсорбційному спектрометрі Varian Spectr AA 110 (США) за довжини хвилі 589.0 нм або 766.5 нм в полум'ї повітря/ацетилен (визначення Na⁺ (натрій-іона) і K⁺ (калій-іона)); методом аргентометричного титрування (визначення хлорид-іонів); методом комплексометричного титрування (ДФУ, 2.5.11) (визначення магнію); методом потенціометрії (ДФУ, 2.2.3) на рН-метрі марки МР-512 (визначення рН) з використанням ваг електронних Sartorius VA 210S і мірного посуду класу А.

Основними якісними та кількісними показниками якості препарату є показники «Ідентифікація», «Кількісне визначення» та «Речовини,

Рисунок 1



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Ac.Succinicium	2.121	399872	71898		
2	Arginin	5.315	6683687	351703		

Хроматограма випробовуваного розчину препарату для визначення тесту «Кількісне визначення. Сукцинат-іон і аргінін-іон»

виявлювані нінгідрином», розробці яких і присвячене це дослідження. Також препарат було стандартизовано за всіма показниками якості, які є необхідними для лікарських засобів для парентерального застосування, а саме розчинів для інфузій, відповідно до вимог ДФУ [17].

Для ідентифікації діючих речовин — сукцинат- і аргінін-іона — в розчині для інфузій використовували метод РХ [18, 19], який нами запропоновано для їх одночасного кількісного визначення. Збіг часів утримування піків кислоти бурштинової або аргініну на хроматограмах випробовуваного розчину та хроматограмах розчину порівняння, який містить СЗ аргініну і кислоти бурштинової, при детектуванні за довжини хвилі 200 нм підтверджує ідентичність цих речовин. Час утримування піка кислоти бурштинової — близько 2.1 хв, піка аргініну — близько 5.3 хв (Рис. 1).

Також для проведення ідентифікації іонів використовували специфічні реакції, а саме: для натрію — характерну реакцію (с) на натрій (ДФУ, 2.3.1); для калію — характерну реакцію (b) на калій (ДФУ, 2.3.1); для хлоридів — характерну реакцію (a) на хлориди (ДФУ, 2.3.1) і для магнію — характерну реакцію на магній (ДФУ, 2.3.1).

Одночасне кількісне визначення сукцинат-іона та аргінін-іона методом РХ запропоновано проводити в таких умовах: хроматографічна колонка Waters Spherisorb CNRP розміром 250 мм × 4.6 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм; рухома фаза: ацетонітрил — буферний розчин рН 6.0 (1:99); детектування за довжини хвилі 200 нм. Доказ придатності умов хроматографічного визначення сукцинат-іона та аргінін-іона у препараті забезпечується вве-

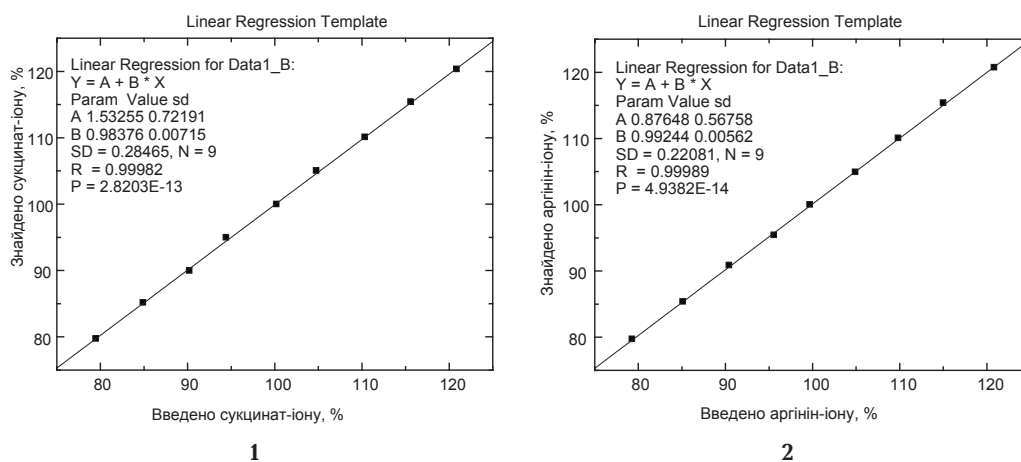
денням у методику тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи», який включає всі необхідні вимоги до аналітичної системи: ефективність хроматографічної колонки, розрахована для піків кислоти бурштинової і аргініну, має бути не менше 1000 теоретичних тарілок; коефіцієнт розділення піків кислоти бурштинової та аргініну має бути не менше 3.0; коефіцієнти симетрії піків кислоти бурштинової та аргініну мають бути не більше 2.5; відносне стандартне відхилення (RSD), розраховане для площ піків кислоти бурштинової та аргініну, має відповідати вимогам ДФУ, 2.2.46.

Методика визначення тесту «Кількісне визначення. Сукцинат-іон і аргінін-іон» у розчині для інфузій методом РХ валідована відповідно до вимог ДФУ, стаття «Валідація аналітичних методик і випробувань» [17], виходячи з того, що діапазон застосування запропонованої методики має бути не менше ± 20 % від номінального вмісту, тобто від 80 % до 120 %.

У Табл. 1 і 2 наведено результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка для оцінки прецизійності, правильності та лінійності. З даних цих таблиць зрозуміло, що для сукцинат-іона та аргінін-іона методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю). Знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0.64 % і 0.45 % для сукцинат-іона та аргінін-іона відповідно) менше критичного значення для збіжності результатів (3.2 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики: систематична похибка методики 0.07 % для сукцинат-іона і 0.14 % для аргінін-іона є статистично і практично незначущою, тобто методика аналізу характери-

Рисунок 2



Лінійна залежність площ піків від концентрації в нормалізованих координатах: 1 — для сукцинат-іона; 2 — для аргінін-іона

Таблиця 1

Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення сукцинат-іона

№ модельного розчину	Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{str}$ %)	Середні площі піків (S_i) ($S_{st} = 401237$)	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{str}$ %)	Знайдено в % до введеного ($Z_i = Y_i/X_i$ %)
1	79.50	319665	79.67	100.21
2	84.93	341493	85.11	100.21
3	90.25	360832	89.93	99.64
4	94.45	380854	94.92	100.50
5	100.22	401036	99.95	99.73
6	104.80	421178	104.97	100.16
7	110.37	441521	110.04	99.70
8	115.65	462867	115.36	99.75
9	120.91	482648	120.29	99.49
Середнє, $Z_{серп}$ %				99.93
Відносне стандартне відхилення, RSD_{z_i} %				0.34
$RSD_z (\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$				
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_i(\%) = t(95\%, n-1) \times RSD_z = 1.860 \times RSD_{z_i}$ %				0.64
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{Asr} % (гранична невизначеність)				3.2
Систематична похибка $\delta = Z_{серп} - 100 $				0.07
Критерій незначущості систематичної похибки				Виконується
$1) \leq \delta = \frac{\Delta_{\delta_{теор}}}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_{\delta_{теор}}}{3} = 0.64 / 3 = 0.21 (0.07 \leq 0.21)$				
2) застосовувати в тому випадку, якщо не виконується вимога до критерію (1): $\delta \leq \delta_{теор} (1.02) (0.07 \leq 1.02)$				Виконується
Загальний висновок про методу				Коректна

зується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій 80 – 120 % (Табл. 1 і 2).

Отже, підтверджено лінійність, прецизійність (збіжність) і правильність визначення сукцинат-іона та аргінін-іона методом РХ в діапазоні використання від 80 % до 120 %.

Розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = b \times X_i + a$ (за даними Табл. 1 і 2) був проведений методом найменших квадратів. На Рис. 2 наведено лінійну залежність площ піків від концентрації сукцинат-іона та аргінін-іона в нормалізованих координатах. Результати, наведені в Табл. 3, свідчать про виконання вимог до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій 80–120 %.

Прогнозована повна невизначеність результатів 0.74 % для сукцинат-іона і 1.68 % для аргінін-іона не перевищує критичного значення (3.2 %), тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях за показником «Кількісне визначення. Сукцинат-іон і аргінін-іон» методом РХ.

На підставі результатів кількісного визначення сукцинат-іона та аргінін-іона в препараті, а також вимог ДФУ введений такий інтервал вмісту, як для діючої речовини сукцинат-іона та аргінін-іона, тобто ± 10.0 % від номінального вмісту в 1 мл препарату.

Для кількісного визначення вмісту Na^+ (натрій-іона) і K^+ (калій-іона) запропоновано використовувати високоселективний та чутливий метод — атомно-абсорбційну спектрометрію (ДФУ, 2.2.23). Випробовувані розчини готували шляхом розведення препарату за допомогою води: для натрію — до концентрації натрію 4.0 мкг/мл, для калію — 11.0 мкг/мл. Калібрувальні розчини для визначення натрію готували з розчину *натрію* (ДФУ, 2.2.23, N) з концентрацією іонів натрію 200 мкг/мл за допомогою розведення водою до концентрації натрію в діапазоні 1.6 – 6.0 мкг/мл. Калібрувальні розчини для визначення калію готували з розчину *калію* (ДФУ, 2.2.23 N) з концентрацією іонів калію 600 мкг/мл за допомогою розведення водою до концентрації калію в діапазоні 4.8–18.0 мкг/мл.

Методику апробовано на зразках досліджуваного засобу і на підставі проведених досліджень встановлено інтервал вмісту Na^+ (натрій-іона) і K^+ (калій-іона) $\pm 10.0\%$ від номінального вмісту (у ммольях в 1 л препарату).

Для кількісного визначення хлорид-іонів, які є складовою частиною натрію хлориду для рутинного контролю розчину для інфузій, нами запропоновано методику прямого аргенто-

метричного титрування методом Мора: 10.0 мл препарату титрують 0.1 М розчином срібла нітрату до переходу забарвлення з світло-жовтою в оранжево-буре, використовуючи як індикатор 0.25 мл розчину калію хромату Р. 1 мл 0.1 М розчину срібла нітрату відповідає 3.5456 мг Cl^- (хлорид-іонів), яких в 1 л розчину для інфузій має бути від 90 % до 110 % від заявленого вмісту.

Таблиця 2

Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення аргінін-іона

№ модельного розчину	Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}, \%$)	Середні площі піків (S_i) ($S_{st} = 6686492$)	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}, \%$)	Знайдено в % до введеного ($Z_i = Y_i/X_i, \%$)
1	79.32	5327528	79.68	100.45
2	85.14	5705115	85.32	100.21
3	90.46	6073141	90.83	100.41
4	95.61	6377813	95.38	99.76
5	99.73	6683917	99.96	100.23
6	104.94	7012893	104.88	99.94
7	109.86	7355610	110.01	100.14
8	115.05	7712399	115.34	100.25
9	120.88	8068289	120.67	99.83
Середнє, $Z_{сер}, \%$				100.14
Відносне стандартне відхилення, $RSD_{Z_i}, \%$				0.24
$RSD_{Z_i}(\%) = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$				
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_t(\%) = t(95\%, n-1) \times RSD_{Z_i} = 1.860 \times RSD_{Z_i}, \%$				0.45
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}, \%$ (гранична невизначеність)				3.2
Систематична похибка $\delta = Z_{сер} - 100 $				0.14
Критерій незначущості систематичної похибки 3) $\delta \leq \frac{\Delta_{теор}}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_{теор}}{3} = 0.45/3 = 0.15 (0.14 \leq 0.15)$				Виконується
4) застосовувати в тому випадку, якщо не виконується вимога до критерію (1): $\delta \leq \delta_{теор} (0.14 \leq 1.02)$				Виконується
Загальний висновок про методику				Коректна

Таблиця 3

Метрологічні характеристики лінійної залежності методики кількісного визначення сукцинат-іона та аргінін-іона

Величина	Значення		Критерій (для допусків 90–110 %), $g = 9$		Висновок
	Сукцинат-іон	Аргінін-іон	Сукцинат-іон	Аргінін-іон	
b	0.98376	0.99244			—
S_b	0.00715	0.00562			—
a	1.53255	0.87648	1) $\leq 1.895 \times S_a = 1.37$	1) $\leq 1.895 \times S_a = 1.08$	Відповідає
			2) якщо не виконується 1), то ≤ 5.3		
S_a	0.72191	0.56758	—	—	—
S_r	0.28465	0.22081	—	—	—
r	0.99982	0.99989	≥ 0.9924		Відповідає

Кількість іонів магнію визначалася за допомогою комплексонометричного титрування проби 0.005 М розчином натрію едетату в присутності *індикаторної суміші протравного чорного 11 Р* до переходу забарвлення з фіолетово-рожевого в синє. Методику апробовано на зразках досліджуваного засобу і на підставі проведених досліджень встановлено інтервал вмісту Mg^{2+} (магній-іонів) $\pm 10.0\%$ від номінального вмісту (у ммольях в 1 л препарату).

Супровідні домішки в розчині для інфузій. Відповідно до ЄФ [15] і ДФУ [16], як домішки в амінокислотах методом тонкошарової хроматографії визначають речовини, виявлювані нінгідрином, при цьому в субстанції аргініну допускається наявність таких речовин не більше 0.5%. Зважаючи на це, в готовому лікарському препараті у вигляді розчину для інфузій, який містить як один з АФІ сукцинат діаргініну, також доцільно контролювати саме речовини, виявлювані нінгідрином.

Для визначення кількості супровідних домішок в препараті нами запропоновано використовувати метод тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27): хроматографічні пластинки Кизельгель 60 (фірма Merck, Німеччина) розміром 10 × 20 см з товщиною шару 0.2 мм; рухома фаза: *кислота оцтова льодяна Р – вода Р – бутанол Р (1:1:2)*. Хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде близько 15 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать на повітрі протягом 20 хв, обприскують розчином *нінгідрину Р* і витримують у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв. Тобто, умови проведення визначення супровідних домішок, а саме рухома фаза, відрізняються від тих, що запропоновані для субстанції аргініну відповідно до вимог ЄФ і ДФУ. Це пов'язано з наявністю інших діючих речовин в лікарському препараті й необхідністю усунення їх впливу на методику визначення супровідних домішок. Результати аналізу вважаються достовірними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (b), який містить *ФСЗ ДФУ аргініну* і *ФСЗ ДФУ кислоти аспарагінової*, виявляються дві чітко розділених плями. Для визначення вмісту домішок у випробуваному розчині використовують як розчин порівняння розведений розчин *ФСЗ ДФУ аргініну* (розчин порівняння (a)).

Вміст домішок у препараті нормується на рівні, аналогічному для субстанції аргініну: допускається наявність будь-якої домішки не більше 0.5%. Було встановлено, що нормування домішок підтверджується протягом усього терміну придатності, про що свідчать дані з вивчення стабільності.

З метою визначення оптимального інтервалу рН для забезпечення стабільності розчину протягом терміну зберігання враховували результати аналізу фізико-хімічних властивостей діючих речовин та вихідних реагентів для їх отримання, а також їх стійкість у розчині за одночасної присутності залежно від різних факторів, шляхів деструкції, насамперед під час гідролізу деяких з них, та шляхів попередження деструктивних процесів. Зниження рН розчину до рівня менше 7.2 приводить до збільшення тривалості солеутворення, окрім того, таке значення рН знаходиться надто далеко від розрахованих значень точок еквівалентності для утворення солей кислоти бурштинової. Збільшення рН середовища вище 8.0 не є доцільним, оскільки, по перше, значно відрізняється від рН крові. По-друге, під час створення інфузійної лікарської форми також необхідно враховувати стабільність розчину в процесі зберігання в пляшках зі скла, укупованих пробками з гуми або відповідних полімерів. Тривалий контакт скла пляшки з водним розчином може призводити до деструкції внутрішнього шару скла і переходу його частинок у рідку фазу. В розчині можуть з'являтися механічні включення, відсутність яких суворо регламентується для інфузійних розчинів [17]. Також процеси взаємодії продуктів деструкції скла і компонентів розчину можуть викликати зміну фізико-хімічних показників розчину і призводити до невідповідності якості готового продукту вимогам нормативної документації. Слід також враховувати вплив матеріалу пробки, який залежить від складу і від технології їх виробництва. Описані процеси взаємодії скла та гуми з розчином прогресують при збільшенні рН середовища. В процесі досліджень комбінованого розчину для інфузій з різними значеннями рН, включаючи критичні, експериментально встановлено оптимальні межі рН розчину — від 7.2 до 8.0.

Висновки

1. Створено аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки і стандартизовано методи контролю якості за основними показниками відповідно до вимог ДФУ до лікарських препаратів для парентерального застосування (розчинів для інфузій) для розробки комбінованого оригінального препарату для лікування критичних станів різної етіології.

2. Розроблено, стандартизовано та проведено валідацію методики ідентифікації та кількісного визначення сукцинат-іона та аргінін-іона в готовій лікарській формі з використанням ме-

тоту рідинної хроматографії для аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки. Проведені валідаційні дослідження для тесту «Кількісне визначення. Сукцинат-іон і аргінін-іон» підтверджують відповідність критеріям прийнятності таких валідаційних характеристик, як прогноз повної невизначеності аналізу, специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність.

3. Запропоновано методику кількісного визначення Na^+ (натрій-іона) і K^+ (калій-іона) з використанням високоселективного та чутливого методу атомно-абсорбційної спектрометрії.

4. Розроблено методику прямого аргентометричного титрування методом Мора для кількісного визначення хлорид-іонів, які є складовою частиною натрію хлориду. Розроблено методику кількісного визначення іонів магнію за допомогою комплексонометричного титрування.

5. Розроблено та доведено придатність методики визначення супровідних домішок у розчині для інфузій методом тонкошарової хроматографії.

6. Експериментально встановлено оптимальні межі рН розчину для інфузій — від 7.2 до 8.0 для забезпечення стабільності розчину протягом терміну зберігання.

ЛІТЕРАТУРА

- Инфузионная терапия: курс на сбалансированность // Общие и неотложные состояния в практике врача. — 2015. — № 6 (56). — С. 40-46.
- Компендиум. Лекарственные препараты [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://compendium.com.ua/>.
- Патент України № 74117, кл. МПК А61К 31/13, А61Р 25/32, А61Р 39/06. Засіб для профілактики та зняття алкогольної інтоксикації. Опубл. 25.10.2012, офіц. бюлетень «Промислова власність» № 20, 2012.
- Рациональная инфузионная терапия / В.И. Черный, А.Н. Колесников, К.Н. Олейников и др. — Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2012. — 186 с.
- Инфузионная терапия при критических состояниях / А.С. Владыка, В.В. Суслев, О.А. Тарабрин; под ред. проф. В.В. Суслева. — Киев: Логос, 2010. — 274 с.: ил. — библиогр.: с. 253 — 272.
- Патент України № 39083, кл. МПК А61К 31/185, А61Р 39/00. Продукт (препарат) для зняття ознак інтоксикації будь-якої етіології — «Янтарин-детокс». Опубл. 10.02.2009, офіц. бюлетень «Промислова власність» № 3, 2009.
- Патент України № 40222, кл. МПК А61К 33/06, А61Р 39/00. Магнесгель для лікування гіперінтоксикації у дітей та дорослих та спосіб його одержання. Опубл. 16.07.2001, офіц. бюлетень «Промислова власність» № 6, 2001.
- Патент Російської Федерації № 2039556, кл. МПК А61К31/19, А61К47/00. Опубл. офіц. бюл. «Изобретения» від 20.07.1995.
- Булдаков А.С. Харчові добавки. Довідник. — СПб, «VG», 1996. — С. 75.
- Авторське свідоцтво № 1630043, кл. МПК А61К31/19, А61К35/16. Опубл. офіц. бюл. «Изобретения» від 28.02.1994.
- Патент Російської Федерації № 2488382, кл. МПК А61К9/08, А61К 33/14, А61К31/10, А61Р39/00, А61Р25/02. Опубл. офіц. бюл. «Изобретения. Полезные модели» від 27.02.2013.
- Патент Російської Федерації № 2549448, кл. МПК А61К9/08, А61К1/198, А61К33/14, А61К33/06, А61К47/48, А61Р7/08. Опубл. офіц. бюл. «Изобретения. Полезные модели» від 27.04.2015.
- Патент України № 30561. МПК А61К31/185, А61К9/08. Опубл. 25.02.2008, офіц. бюлетень «Промислова власність» № 4, 2008.
- Патент України на корисну модель № 103424. МПК А61К9/08, А61К31/00. Комбінований лікарський засіб у формі інфузійного розчину. Опубл. 10.12.2015, офіц. бюлетень «Промислова власність» № 23, 2015.
- European Pharmacopoeia. — 9th ed. — Strasbourg: EDQM. — 2017.
- Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — Т. 2. — 724 с.
- Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.
- Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2011. — 1440 с.
- Хроматографические методы в аналитическом обеспечении создания и контроля качества лекарственных средств в Украине / В.П. Георгиевский, Г.В. Георгиевский, А.А. Зинченко, А.Ю. Куликов и др.; под ред. член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2016. — 288 с.

УДК 615.07:615.384:615.456.1

Резюме

Назарова Е. С., Вербова Ю. М., Алмакаева Л. Г., Бегунова Н. В., Доля В. Г.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения»

Национальный фармацевтический университет

Аналитическое обеспечение фармацевтической разработки комбинированного оригинального препарата в форме раствора для инфузий для лечения критических состояний различной этиологии

Учитывая многофакторную этиологию и патогенез критических состояний организма человека, учитывая основные патологические процессы, возникающие при этом, для повышения эффективности и расширения спектра специфической активности известных ранее препаратов такого действия предложено применять янтарную кислоту в виде соли с аргинином. Также для большей фармакологической эффективности предлагаемой комбинации были исследованы возможности использования органических солей магния, что также повышает биодоступность препарата и расширяет спектр его фармакологического действия за счет фармакологического влияния самих кислот. В состав препарата также введены компоненты, которые обеспечили соответствие его ионного состава и теоретическую осмолярность таковым показателям для плазмы крови, то есть сбалансированность раствора, — это натрия и калия хлориды. Представлено в соответствии с требованиями ГФУ аналитическое обеспечение фармацевтической разработки основных показателей качества комбинированного оригинального препарата в форме раствора для инфузий для лечения критических состояний различной этиологии. Разработаны, стандартизированы и валидированы методики идентификации и количественного определения

сукцинат-иона и аргинин-иона в готовой лекарственной форме с использованием метода жидкостной хроматографии. Проведенные валидационные исследования для теста «Количественное определение» сукцинат-иона и аргинин-иона подтверждают соответствие таких валидационных характеристик, как прогноз полной неопределенности анализа, специфичность, линейность, прецизионность (сходимость) и правильность, критериям приемлемости. Разработана методика количественного определения натрий- и калий-ионов с использованием метода атомно-абсорбционной спектроскопии, магний-иона — методом комплексометрического титрования и хлорид-иона — методом аргентометрического титрования. Представлена методика для определения сопутствующих примесей (веществ, выявляемых нингидрином) с использованием метода тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: аргинин, кислота янтарная, фармацевтическая разработка, метод жидкостной хроматографии, метод атомно-абсорбционной спектроскопии, стандартизация, валидация, раствор для инфузий.

UDC 615.07:615.384:615.456.1

Summary

Nazarova O. S., Verbova Yu. M., Almakaeva L. G., Begunova N. V., Dolya V. G.
State Enterprise «State Scientific Center for Drugs and Medical Devices» Kharkiv, Ukraine
National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

Analytical support of the pharmaceutical development of the combined original preparation in the form of a solution for infusion to treat critical states of various etiologies

Taking into account the multifactorial etiology and pathogenesis of critical states of the human body, taking into account the basic pathological processes arising in this case, it is proposed to use amber acid in the form of salt with arginine to increase the efficiency and expand the spectrum of specific activity of previously known preparations of such action. Also, for greater pharmacological efficacy of the proposed combination, the possibility of using organic magnesium salts was investigated, which also increases the bioavailability of the drug and broadens the spectrum of its pharmacological action due to the pharmacological effect of the acids themselves. The composition of the drug also introduced components that ensured its ionic composition and theoretical osmolarity of these parameters for plasma, that is, the balance of the solution — is sodium and potassium chlorides. Creation of a new effective national infusion preparation for the treatment of severe conditions (including for urgent use) makes it urgent to conduct analytical support for the pharmaceutical development of this dosage form. According to the requirements of the State

Pharmacopoeia of Ukraine, analytical support is provided for the pharmaceutical development of the main quality indicators of a combined original preparation in the form of a solution for infusions for the treatment of critical conditions of various etiologies. Methods for the identification and quantification of succinate-ion and arginine-ion in the finished dosage form have been developed, standardized and validated using the liquid chromatography method for analytical support of pharmaceutical development. The conducted validation studies for the «Quantitative determination» succinate-ion and arginine-ion test confirm the compliance of such validation characteristics as the forecast of complete uncertainty of the analysis, specificity, linearity, precision (convergence), and the validity of the eligibility criteria. A method for quantitative determination of sodium and potassium ions using the method of atomic absorption spectrometry, magnesium-ion — method of complexometric titration and chloride ion — by the method of argentometric titration was developed. A technique for determining the accompanying impurities (substances detected by ninhydrin) using thin layer chromatography is presented.

Keywords: arginine, succinic acid, pharmaceutical formulation, liquid chromatography method, atomic absorption spectrometry method, standardization, validation, infusion solution.

Назарова Олена Сергіївна. К. фарм. н. (2005), старш. наук. співроб. (2016). Зав. лабораторії аналізу, якості та стандартизації лікарських препаратів ДП «ДНЦЛЗ» (з 2009).

Вербова Юлія Михайлівна. Наук. співроб. лабораторії аналізу, якості та стандартизації лікарських препаратів ДП «ДНЦЛЗ» (2009).

Алмакаєва Людмила Григорівна. Д. фарм. н. (2008), професор (2015). Зав. науково-дослідної лабораторії парентеральних та оральних рідких лікарських засобів, професор кафедри управління якістю НФаУ.

Бегунова Наталія Власівна. К. фарм. н. (2006), старш. наук. співроб. (2015), старш. наук. співроб. науково-дослідної лабораторії парентеральних та оральних рідких лікарських засобів НФаУ.

Доля Володимир Григорович. К. фарм. н. (2002), старш. наук. співроб. науково-дослідної лабораторії парентеральних та оральних рідких лікарських засобів НФаУ.

Фармакологічні дослідження

УДК 576.3:615.451.13:542.64

Гудзь Н. І., Кобилінська Л. І., Філіпська А. М.,
Дмитруха Н. М., Лагутіна О. С., Коритнюк Р. С.
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», Київ
Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ

Визначення життєздатності клітин під час фармацевтичної розробки розчинів для перитонеального діалізу

Для вивчення біосумісності розчинів для перитонеального діалізу (ПД) проводяться дослідження, серед яких поширеними є визначення цитотоксичної активності на культурі клітин *in vitro*. Літературні дані свідчать, що традиційні розчини для ПД мають низьку біосумісність через високі значення вмісту глюкози, лактату, продуктів деградації глюкози (ПДГ) і осмолярності та низьке значення рН. Однак залишається нез'ясованим, наскільки біосумісність притаманна кожному окремому чиннику або їх комбінації. Наші дослідження підтвердили гіпотезу про негативний вплив комбінації факторів — низьких значень рН розчинів (5.11 – 5.77), ПДГ, високого вмісту глюкози, натрію лактату та підвищеної осмолярності розчинів для ПД — на життєздатність клітин лінії Vero. Встановлено, що в присутності ізотонічного розчину натрію хлориду (24.69 %) виживаність клітин була вищою порівнюючи з розчинами для ПД різного складу (11.86 – 16.08) %. Значення коефіцієнта кореляції 0.31 між показниками зростання життєздатності і збільшенням рН розчину після стерилізації характеризує зв'язок між величинами як слабкий. Коефіцієнт кореляції 0.202 між показниками зменшення життєздатності і збільшення оптичної густини розчину після стерилізації за 228 нм також вказує на слабкий кореляційний зв'язок між цими величинами. Результати літературних даних та власних досліджень доводять, що під час розробки технології розчинів для ПД необхідно досягнути балансу між рН розчину для ПД до і після стерилізації та ступенем деградації глюкози.

Ключові слова: розчини для перитонеального діалізу, життєздатність клітин, МТТ-тест, культура клітин лінії Vero.

Під час розробки та медичного застосування розчинів для перитонеального діалізу (ПД) (синонім: перитонеальні діалізні розчини (ПДР)) вивчається біосумісність цих розчинів за морфологічними властивостями перитонеальних мезотеліальних клітин (ПМК), визначенням таких маркерів в діалізаті, як раковий антиген-125, фактор росту судинного ендотелію, запальні цитокіни та хемокіни (трансформуючий фактор росту β , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8), фібронектин, колаген-І, проколаген І, за вивченням життєздатності клітин *in vitro*, *ex vivo*, за результатами епідеміологічних клінічних досліджень, кількістю клітин у діалізатах тощо [1-7]. Раковий антиген-125 розглядається як маркер біомаси ПМК [6, 8, 9]. Хемокіни, цитокіни, фактори росту і кількість клітин в діалізаті розглядаються як маркери перитонеального запалення та ремоделювання тканин [9]. Біосумісні ПДР сприяють захисту і збереженню функцій перитонеальної мембрани, залишкової функції нирок, знижують частоту епітеліально-мезенхіальних перетворень ПМК та виникнення перитоніту, характеризуються вищим вмістом ракового антигену-125 в діалізаті, активацією ПМК і нижчою швидкістю апоптозу клітин [4-10].

Біосумісність — це здатність методу чи системи виконувати функції без спричинення сут-

тєвих побічних реакцій. У ПД концепція біосумісності раніше застосовувалася для вивчення впливу ПДР на біологічний відгук перитонеальних тканин і клітин, морфологію й функції очеревини [10].

Традиційні розчини для ПД — це розчини, які містять глюкозу і натрію лактат в однокамерних контейнерах. Вони не є біосумісними через високий вміст глюкози (76, 126 і 215 ммоль/л), лактату (35 і 40 ммоль/л) та продуктів деградації глюкози (ПДГ), зокрема 3,4-дидеоксиглюкозон-3-ен (3,4-ДГЕ), низькомолекулярних альдегідів та кислот, а також низьке значення рН (5 – 6), високу осмолярність (від 435 до 511 мосмоль/л). Ці фактори можуть мати негативний вплив на клітинні системи, включаючи дисфункцію та зниження життєздатності ПМК, перитонеальних макрофагів та лейкоцитів (моноцитів, нейтрофілів) [1, 6-8, 10, 11]. Як зазначає Ortiz та співавт., неможливо відрізнити токсичні ефекти самої глюкози у високих концентраціях від продуктів її деградації [10].

Необхідним етапом оцінки безпечності фармацевтичних субстанцій та препаратів на доклінічному етапі їх дослідження в рамках системи належної лабораторної практики є визначення цитотоксичності в умовах *in vitro* на культурі клітин. У цитологічних дослідженнях найчастіше використовують культури клітин, які набули

здатності до необмеженого росту і розмноження. Їх одержують із злоякісних пухлин або з нормальних людських чи тваринних тканин, які мають змінений каріотип. Вони широко використовуються в лабораторній практиці, оскільки здатні швидко та інтенсивно розмножуватись у пробірках і є дуже чутливими. Такі клітини отримують із центральних банків тканинних культур [12, 13, 18]. Найпоширенішими є лінії культури клітин Vero (нирка зеленої мавпи) та фібробласти мишей L-929. Метод з використанням фібробластів мишей L-929 є міжнародним методом, що застосовується як перша лінія в скринінгу виявлення основної цитотоксичності [1], а також як швидкий метод для визначення цитотоксичності розчинів для ПД [2].

Метою нашої роботи було визначення цитотоксичної активності ПДР з різною концентрацією глюкози, вмістом ПДГ та рН в умовах *in vitro* на культурі клітин лінії Vero, порівняння отриманих результатів експерименту з літературними даними.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували розчин натрію хлориду ізотонічний та розчини для ПД, склад яких представлений у Табл. 1.

Процес деградації глюкози оцінювали за зміною значення рН після стерилізації, значенням оптичної густини за довжини хвилі 228 – 230 нм і в діапазоні 273 – 286 нм. Згідно з літературними даними та власними дослідженнями, 3,4-ДГЕ має максимум поглинання за 228 нм, 5-ГМФ — за 284 нм. Значення рН досліджуваних розчинів вимірювали на рН-метрі «рН-150 М» (Білорусь) в інтервалі температур 20 – 25 °С. Перед вимірюваннями рН-метр калібрували за допомогою буферних розчинів зі значеннями рН 4.01, 6.87 і 9.18 [14-15].

Об'єктом дослідження в умовах *in vitro* була культура клітин лінії Vero (клітини нирки африканської мавпи). Для оцінки впливу ПДР на життєздатність клітин використано загально-визнаний МТТ-тест. Цей метод базується на здатності ферменту мітохондріальної мембрани — сукцинатдегідрогенази — відновлювати жовту сіль 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію бромід (МТТ) до кристалів формазану фіолетового кольору, які утворюються в результаті цієї реакції у цитоплазмі живих клітин. За інтенсивністю накопичення кристалів формазану в цитоплазмі можна судити про рівень мітохондріальної активності (дихання), що є показником функціональної активності та життєздатності клітини [16].

Під час досліду суспензію клітин у концентрації 1×10^5 клітин/мл вносили по 100 мкл у кожен лунку 96-лункового планшета. Інкубували клітини 24 год для адгезії клітин та утворення моношару в лунках. Середовище видаляли, потім у кожен дослідну лунку вносили по 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду або розчину для ПД в двох повторях. У контрольні лунки додавали по 100 мкл культурального середовища без розчину для ПД. Планшети інкубували в CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С упродовж 24 год. Після припинення інкубації в кожен лунку вносили по 10 мкл розчину МТТ та інкубували 3 год у CO₂-інкубаторі. Для приготування робочого розчину 50 мг МТТ (Sigma) розчиняли в 10 мл розчину Хенкса, фільтрувати крізь стерильний целюлозно-ацетатний мембранний фільтр. Після закінчення інкубації планшети центрифугували протягом 5 хв при швидкості 1500 об/хв, потім видаляли з лунок надосадову рідину та додавали у кожен лунку по 50 мкл диметилсульфоксиду (Sigma) для розчинення кристалів формазану. Планшети

Таблиця 1

Склад досліджуваних розчинів

Номер зразка (ідентифікація зразка)	Концентрація іонів, ммоль/л					Концентрація глюкози моногідрату, г/л
	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	CH ₃ CH(OH)COO ⁻	
0	154	—	—	154	—	—
1 (10413)	132	1.25	0.25	95	40	15.0
2 (20413)	132	1.25	0.25	95	40	42.5
3 (30513)	132	1.25	0.25	95	40	15.0
4 (40513)	132	1.25	0.25	95	40	42.5
5 (10415)	132	1.25	0.25	100	35	15.0
6 (20415)	132	1.25	0.25	100	35	25.0
7 (30415)	132	1.25	0.25	100	35	42.5
8 (21116)	132	1.25	0.25	95	40	42.5
9 (10117)	132	1.25	0.25	95	40	25.0

втримували при кімнатній температурі 30 хв, потім визначали оптичну густину вмісту лунок за довжини хвилі 540 нм за допомогою мульти-лункового спектрофотометра Surise Tecan (Австрія). Кількість життєздатних клітин визначали за формулою:

$$\text{КЖК} = \text{ОГ}_{\text{ДК}} / \text{ОГ}_{\text{КК}} \times 100 \%,$$

де КЖК — кількість життєздатних клітин (%);

$\text{ОГ}_{\text{КК}}$ — оптична густина в лунках з досліджуваними розчинами для ПД або з 0.9% розчином натрію хлориду;

$\text{ОГ}_{\text{ДК}}$ — оптична густина в лунках з культуральним середовищем [16].

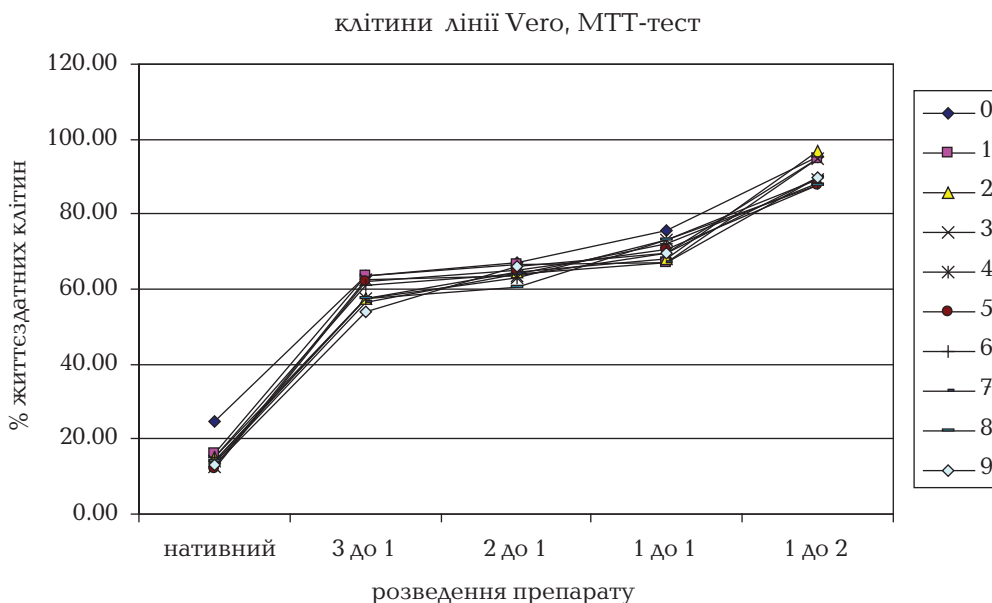
Для характеристики залежності між цитотоксичною дією досліджуваних розчинів для ПД *in vitro* та їх складом було проведено статистичний кореляційний аналіз обох рядів результатів. Визначено коефіцієнт кореляції (r) між показниками за дії кожного ПДР залежно від складу розчину. При цьому вважали, що при $r = 1$ між двома величинами існує тісний функціональний зв'язок. Відповідно, за величиною коефіцієнта кореляції можна судити про взаємозв'язок між показниками: $0 < |r| < 0.2$ — дуже слабка кореляція; $0.2 < |r| < 0.5$ — слабка кореляція; $0.5 < |r| < 0.7$ — середня кореляція; $0.7 < |r| < 0.9$ — сильна кореляція; $0.9 < |r| < 1$ — дуже висока кореляція. Від'ємні

значення коефіцієнта кореляції свідчать про оберненопропорційний (негативний) зв'язок, тоді як його позитивні значення — про прямопропорційний зв'язок [17].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження впливу ізотонічного розчину натрію хлориду та ПДР на культуру клітин лінії Vero представлені на Рис. 1. Так, у нативній концентрації досліджувані розчини проявляли помірну цитотоксичну активність, кількість життєздатних клітин після 24-годинної інкубації була в межах 11–25 %. При цьому найбільша цитотоксична активність була встановлена для розчину № 5, оскільки після його впливу залишилось 11.86 % живих клітин, а найменша — для зразка № 0 (24.69 % живих клітин) щодо клітин в контрольних лунках. Розчини у розведенні 3:1 (3 частини препарату і 1 частина середовища для культивування) проявляли дещо меншу цитотоксичну дію (кількість життєздатних клітин була в межах 54–64 %). За дії розчинів у розведенні 2:1 (2 частини препарату і 1 частина середовища для культивування клітин) кількість життєздатних клітин визначена в межах 60–67 %. За розведення розчинів середовищем для культивування клітин у співвідношенні 1:1 встановлено їх ще меншу цитотоксичну дію, після інкубації залишалось 67–75 % життєздатних клітин. У розведенні 1:2 (1 частина препарату і 2 частини середовища для культивування) зразки виявляли не-

Рисунок 1



Вживання клітин лінії Vero після інкубації в досліджуваних розчинах різних розведень (дані МТТ-тесту)

Примітка. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 — номери досліджуваних зразків.

значну цитотоксичну дію, при цьому кількість життєздатних клітин лінії Vero була найвищою (87–96 %) (Рис. 1).

Отже, отримані результати дослідження дозволяють дійти висновку, що нативні ізотонічний розчин натрію хлориду та розчини препаратів для ПД проявляли більш виразну цитотоксичну дію, ніж при їх розведенні. Зменшення концентрації препаратів в інкубаційному середовищі клітин лінії Vero шляхом їх розведення сприяло збільшенню кількості життєздатних клітин. Цей факт можна пояснити позитивним впливом зменшення осмолярності, вмісту ПДГ, глюкози й натрію лактату та підвищення рН в інкубаційних пробах на життєздатність клітин.

Досліджуючи цитотоксичність традиційних ПДР, було показано, що за рН 5.5 спостерігається повне інгібування росту клітин, тимчасом як натрію лактат при нейтральному значенні рН не призводив до суттєвих побічних ефектів [8]. З цієї причини Witowski та співавт. проводили дослідження інгібуючого впливу ПДР на життєздатність людських ПМК попередньо нейтралізованими ПДР до рН = 7.3 0.1 М розчином натрію гідрокарбонату [11]. За рН 5.5 проводиться термічна стерилізація традиційних ПДР протягом 15–60 хв при температурі 121 °С. Значення рН цих розчинів після стерилізації знаходиться в межах від 5 до 6 [2, 3, 8, 10, 14, 15, 19, 20]. Кисле значення рН у деяких пацієнтів спричиняє виникнення болю при введенні ПДР у черевну порожнину [10]. Як свідчать власні експериментальні дослідження, у лактатовмісних розчинах зміни рН не спостерігалось за значення рН до стерилізації 5.0–5.25. При зростанні рН від 5.3 до 7.1 до стерилізації відбувається зміна рН (зменшення рН), величина якого залежить від рН до стерилізації, концентрації глюкози, натрію лактату й режиму стерилізації [14, 15, 19, 20, 21]. Протягом стерилізації, крім карбонільних сполук, утворюються низькомолекулярні альдегіди і кислоти в результаті фрагментації молекул глюкози і ПДГ. Серед низькомолекулярних альдегідів були виявлені такі сполуки — метилгліоксаль (0.5–12 $\mu\text{моль/л}$), гліоксаль (0–14 $\mu\text{моль/л}$), формальдегід (3–17 $\mu\text{моль/л}$), ацетальдегід (77–454 $\mu\text{моль/л}$), 5-гідроксиметилфурфурол (5-ГМФ) (6–19 $\mu\text{моль/л}$), 2-фуральальдегід [2, 4, 7, 10, 14, 15, 19, 21, 22].

Під час порівняльного вивчення стимульованого вивільнення інтерлейкіну-6 1L-1 β -інтерлейкіном та життєздатності ПМК від різних донорів у МТТ-тесті у розчинах для ПД, попередньо нейтралізованих до рН 7.3, які містили 1.5 % і 4.25 % глюкози і піддавалися

лише стерилізуючій фільтрації та стерилізуючій фільтрації з наступною термічною стерилізацією, було встановлено такі ефекти під час інкубації клітин у співвідношенні з середовищем 1:1. Розчини для ПД, які піддавалися стерилізуючій фільтрації, не чинили інгібуючого впливу на життєздатність клітин протягом 4 діб. Протягом наступних 6 діб спостерігалось незначне зменшення життєздатності клітин (10 %). У той же час термічно оброблені розчини чинили сильний інгібуючий ефект на життєздатність клітин. У розчині з вмістом 1.5 % глюкози спостерігалась життєздатність на рівні 60 % після інкубації протягом 1 доби й (29.8 \pm 25.0) % після 10 днів інкубації. У розчині з вмістом 4.25 % спостерігалась життєздатність на рівні (36.1 \pm 34.5) % після інкубації протягом 1 доби і \approx 30 % після 10 днів інкубації. Під час порівняльного вивчення життєздатності ПМК після перебування у нативних розчинах протягом 1 год було встановлено, що життєздатність клітин у розчинах, які піддавалися стерилізуючій фільтрації, майже не змінилася, тимчасом у розчинах, що містили 1.5 % і 4.25 % глюкози і які піддавалися термічній стерилізації, життєздатність клітин становила \approx 60 % і 30 % відповідно. Це свідчить про несприятливий вплив ПДГ на життєздатність клітин. Однак протягом наступного перебування клітин у розчинах спостерігалось суттєве погіршення життєздатності клітин у розчинах, як тих, що піддавалися стерилізуючій фільтрації (\approx 50 % за двох концентрацій глюкози), так і тих, що піддавалися термічній стерилізації (30 % і 25 % життєздатності за концентрації глюкози 1.5 % і 4.25 % відповідно) [11]. Дані цих авторів свідчать про те, що життєздатність клітин суттєво знижується при проведенні досліджень з нативними розчинами, а також що за тривалого перебування клітин у розчинах для ПД відбувається зниження життєздатності клітин, ступінь якого більшою мірою залежить від технологічних прийомів (стерилізуюча фільтрація і стерилізуюча фільтрація з наступною термічною стерилізацією) та меншою мірою від концентрації глюкози. На основі цих даних і власних досліджень можна зробити висновок, що при тривалому зберіганні нативні розчини для ПД і розчини, що містять живильне середовище у співвідношенні 1:1, наділені цитотоксичним ефектом стосовно живих клітин, ступінь якого незначно залежить від концентрації глюкози. Попередня нейтралізація розчинів до рН 7.3 для досліджень *in vitro*, а також додавання живильного середовища у великих кількостях нівелює вплив кислого середовища на їх цитотоксичність. За реальних

умов застосування традиційні слабкі кислоти розчини мають прямий контакт з очеревиною, тому дослідження *in vitro* доцільно проводити без нейтралізації і розведення живильним середовищем. Як зазначає Ortiz та співавт., при введенні традиційних розчинів для ПД у перитонеальну очеревиною їх рН досягає 7.0 протягом 30 хв і 7.3 — протягом 90–120 хв [10].

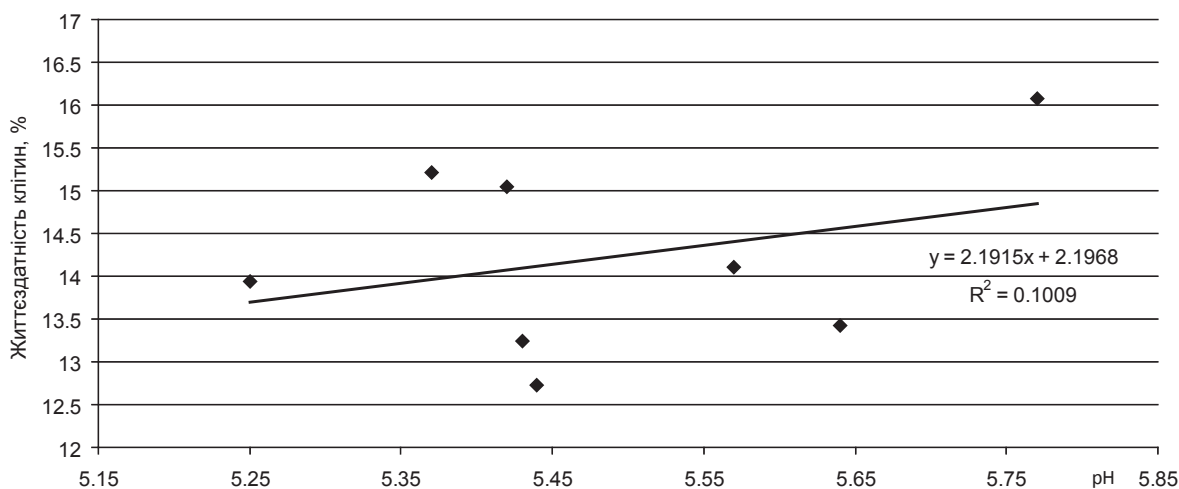
Linden та співавт. проводили дослідження з вивчення цитотоксичності на фібробластах мишей L-929 (CCL-1; ATCC, Rockville, MD, USA) з використанням нейтрального вітального червоного після інкубації об'єктів дослідження протягом 72 год [1]. Як об'єкти дослідження використовувалися 3,4-ДГЕ і традиційні розчини для ПД з вмістом глюкози 1.5 % і 4.25 % і 3,4-ДГЕ 9.9 $\mu\text{моль/л}$ і 22 $\mu\text{моль/л}$ відповідно. Розчини для ПД інкубувалися у розведенні живильним середовищем, яке містить 10 % сироватки телячого плоду, у співвідношенні 5:6 для розчину з вмістом глюкози 1.5 % і 4:7 для розчину з вмістом глюкози 4.25 %. Інгибування росту клітин для розчину з вмістом глюкози 1.5 % було $(21 \pm 4) \%$ за кінцевих концентрацій глюкози і 3,4-ДГЕ у пробі 1.54 % і 4.5 $\mu\text{моль/л}$, а для розчину з вмістом глюкози 4.25 % — $(27 \pm 4) \%$ за кінцевих концентрацій глюкози і 3,4-ДГЕ у пробі 0.68 % і 8 $\mu\text{моль/л}$ відповідно. Для проб, які містили 3,4-ДГЕ у концентраціях 4.5 і 9 $\mu\text{моль/л}$, інгибування росту клітин було 5 % і 10 %, що суттєво нижче, ніж у дослідженні з інкубаційними пробами (розчини для ПД + середовище) з тим самим вмістом 3,4-ДГЕ. Linden та співавт. припускають, що загальна концентрація 3,4-ДГЕ у традиційних розчинах для ПД є значно вищою, ніж та, що кількісно визначається, за рахунок

швидкого утворення 3,4-ДГЕ з пулу його попередників при зменшенні концентрації 3,4-ДГЕ у пробі [1]. На основі власних досліджень це явище можна пояснити ще і тим, що на пригнічення росту клітин, крім концентрації 3,4-ДГЕ, впливає і рН розчину, наявність глюкози й натрію лактату в нефізіологічних концентраціях, вміст інших ПДГ, зокрема 5-ГМФ, гіперосмолярність, однак важко сказати, до якого ступеня ці ефекти можуть приписуватися кожному чиннику.

Наші дослідження підтвердили гіпотезу про негативний вплив кислих значень рН (5.11–5.77), високого вмісту глюкози, натрію лактату та підвищеної осмолярності на біосумісність розчинів *in vitro*, оскільки життєздатність клітин у присутності ізотонічного розчину натрію хлориду була суттєво вищою (24.69 %) порівнюючи з розчинами для ПД різного складу (11.86–16.08) %. Порівняно низьку життєздатність клітин нирки мавпи лінії Vero у присутності ізотонічного розчину натрію хлориду можна пояснити, зокрема, його низьким значенням рН (5.11). Серед усіх чинників найбільший коефіцієнт кореляції ($r = 0.31$) був встановлений між зростанням життєздатності і збільшенням рН розчину після стерилізації. Відповідно до прийнятої практики в статистиці, такий зв'язок характеризується як слабкий. Для розрахунку кореляції не враховувався ізотонічний розчин натрію хлориду і зразок 5, оскільки за майже найвищого значення рН і відсутності ПДГ життєздатність клітин була найнижчою (Рис. 2, Табл. 4).

Коефіцієнт кореляції між зменшенням життєздатності і збільшенням оптичної густини розчину після стерилізації за 228 нм був вста-

Рисунок 2



Оцінка життєздатності клітин нирки мавпи лінії Vero у МТТ-тесті залежно від рН розчинів після стерилізації

Таблиця 2

Фізико-хімічні показники досліджуваних розчинів та життєздатність клітин нирок (лінія Vero) у їх присутності (дані МТТ-тесту після 24 годин інкубації), $M \pm m$

показник	% життєздатних клітин ($M \pm m$)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	5.11	5.77	5.37	5.44	5.25	5.70	5.42	5.64	5.57	5.43
Оптична густина за $\lambda = 228$ нм	0.038	0.340	1.081	0.877	1.587	0.294	0.733	0.349	0.668	0.851
Оптична густина у максимумі в діапазоні $\lambda = 273 - 279$ нм	макс. відс. 0.002 при 273 - 286 нм	макс. відс. 0.043-0.034 при 273 - 286 нм	0.923	0.686	1.695	макс. відс. 0.027 - 0.022 при 273 - 286 нм	0.483	макс. відс. 0.074 - 0.063 при 273 - 286 нм	0.262	0.457
Життєздатність клітин у присутності нативного розчину	24.69 ± 0.52	16.08 ± 0.58	15.21 ± 0.17	12.72 ± 0.58	13.94 ± 0.06	11.86 ± 0.29	15.04 ± 2.31	13.42 ± 0.46	14.11 ± 0.46	13.24 ± 0.17
Життєздатність клітин у присутності розчину і середовища 3:1	63.44 ± 7.46	63.50 ± 0.58	57.66 ± 2.26	62.74 ± 2.49	57.66 ± 6.53	61.99 ± 0.12	61.07 ± 3.59	56.67 ± 0.3	57.66 ± 2.26	54.07 ± 5.03
Життєздатність клітин у присутності розчину і середовища 2:1	67.08 ± 1.73	66.68 ± 2.49	64.48 ± 0.98	63.32 ± 0.98	63.21 ± 2.72	65.06 ± 1.33	63.78 ± 1.10	63.90 ± 0.29	60.55 ± 3.06	65.92 ± 1.27
Життєздатність клітин у присутності розчину і середовища 1:1	75.47 ± 2.37	67.19 ± 2.89	67.83 ± 0.17	69.79 ± 1.33	72.86 ± 1.01	70.78 ± 0.35	72.29 ± 0.92	67.08 ± 4.39	73.21 ± 1.50	69.34 ± 2.49
Життєздатність клітин у присутності розчину і середовища 1:2	95.30 ± 1.74	94.90 ± 1.21	97.04 ± 0.58	94.95 ± 0.58	89.20 ± 1.16	87.67 ± 1.16	88.07 ± 0.87	89.69 ± 0.98	87.67 ± 1.15	89.98 ± 1.50

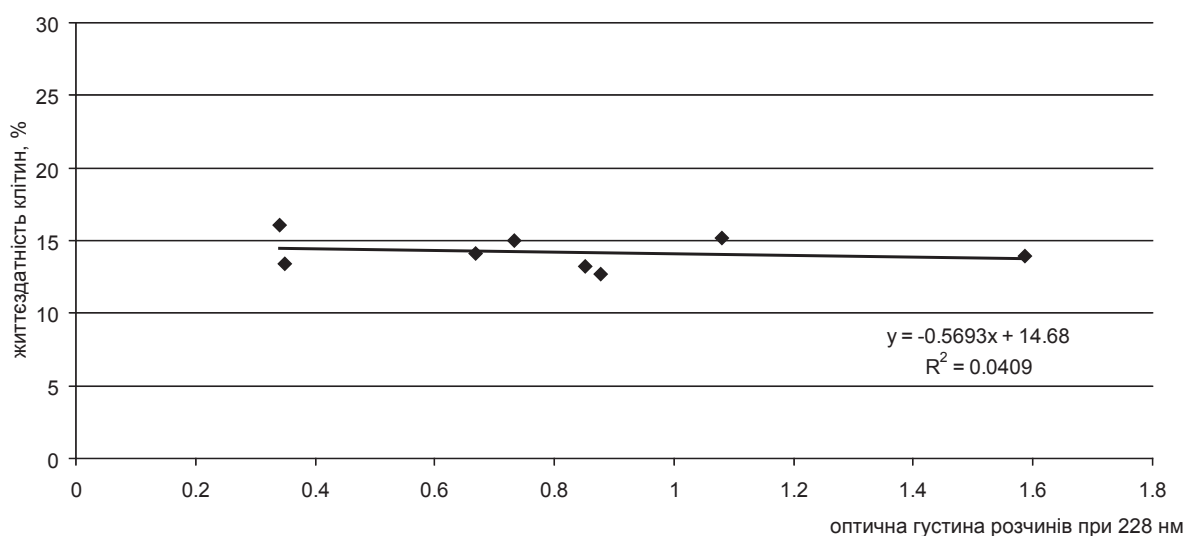
новлений як 0.202, й це характеризує кореляційний зв'язок між величинами також як слабкий, однак з меншим значенням порівнюючи з кореляцією між збільшенням життєздатності і підвищенням рН розчину. Оптична густина за 228 нм характеризує суму чинників: вміст натрію лактату, 5-ГМФ та 3,4-ДГЕ (Рис. 3, Табл. 4). Дані досліджень вказують на те, що під час розробки технології розчинів для ПД необхідно досягнути балансу між рН розчину до і після стерилізації та ступенем деградації глюкози.

Etixon та співавт. встановили добру кореляцію між ступенем інгібування фібробластів мишей (L-929) та концентрацією 3,4-ДГЕ у виготовлених в умовах лабораторії розчинах для ПД з вмістом глюкози 1.5 %: $y = 0.9446x + 27.235$ за $R^2 = 0.8755$, де x — вміст 3,4-ДГЕ (μM) у суміші; розчин для ПД — живильне середовище у співвідношенні 1:1. Також ці вчені встановили, що під час зберігання розчинів при 40°C протягом 60 днів їх інгібуюча дія на фібробласти та ПМК зменшується на паралелі зі зменшенням концентрації 3,4-ДГЕ, а також те, що останні є більш чутливими до розчинів для ПД, ніж фібробласти. Для досліджень використовувалися ПМК 2–3 пасажу з нічних діалізатів від щонайменше 5 донорів; ступінь інгібування росту клітин визначався за методикою з використанням нейтрального червоного. Перед визначенням ступеня інкубування ПМК інкубувалися протягом 72 год при 37°C у суміші з живильним середовищем, яке містило 20 % ембріональної телячої сироватки, незамінні амінокислоти і 2 % L-глутаміну [2].

A. Fernández-Perpén і співавт. встановили, що результати вивчення життєздатності ПМК *in vitro* (72 год) були гіршими порівнюючи з результатами *ex vivo* під час порівняльного вивчення впливу традиційного ПДР і розчину з низьким вмістом ПДГ [5]. У дослідженні використовувалися клітини перитонеальної мембрани, відібрані від неуремічних пацієнтів (*in vitro*), та ПМК, відібрані з діалізатів пацієнтів, які піддавалися лікуванню традиційним ПДР і ПДР з нижчим вмістом ПДГ (*ex vivo*). Під час дослідження *in vitro* було встановлено, що дія традиційного ПДР закінчувалася помітною смертю клітин (плаваючі клітини круглої форми) або набуванням клітинами веретеноподібної форми, меншим вмістом протеїну E-кадгерину і mRNA протеїну E-кадгерину (рибонуклеїнової кислоти), більшим вмістом фактора росту судинного ендотелію. Однак під час дослідження *ex vivo* ПМК від пацієнтів, які піддавалися діалізу лікуванню розчином з низьким вмістом ПДГ, клітини мали тенденцію утримувати епітеліальний фенотип і суттєво нижчий рівень інтерлейкіну IL-8. Вищий рівень інтерлейкіну IL-8 у діалізаті вказує на прозапальний стан очеревини. Інші маркери епітеліально-мезенхімального перетворення (E-кадгерин, фібронектин, колаген I, фактор росту судинного ендотелію, інтерлейкін-8, трансформуючий фактор росту β) мали подібні середні показники у двох групах пацієнтів [5]. Отримані результати, на нашу думку, свідчать про незначну кореляцію результатів *in vitro* та *ex vivo*.

У дослідженнях Distler та співавт. зазначається, що під час дослідження життєздатності

Рисунок 3



Оцінка життєздатності клітин нирки мавпи лінії Vero у тесті МТТ залежно від оптичної густини розчинів за 228 нм після стерилізації

фібробластів мишей лінії NIH 3T3 у присутності традиційного промислово виробленого розчину з вмістом глюкози 4.25 % їх життєздатність після першої доби становила ≈ 140 % щодо життєздатності в нульовій точці. Проте після 2 діб інкубації життєздатність становила вже 27 %. Distler та співав. пояснюють цей факт впливом ПДГ. З іншого боку, після 4 діб життєздатність фібробластів зменшилася до 70 % у присутності розчину для ПД аналогічного складу, який був виготовлений у лабораторних умовах з використанням методу стерильної фільтрації (ПДГ відсутні). Даний факт ці автори пояснюють впливом високої осмолярності та наявності натрію лактату [22].

Варто зауважити, що як традиційні, так і більш біосумісні розчини для ПД пригнічують ріст планктонних мікроорганізмів, зокрема *Coagulase negative Staphylococci*, *Pseudomonas aeruginosa*. Ці штами утворюють біоплівку в присутності розчинів для ПД [23]. Дослідження, опубліковані у 2016 р., пов'язують цей факт з бактеріостатичними властивостями розчинів для ПД, які, можливо, спричинені високим вмістом глюкози, підвищеною осмолярністю, наявністю ПДГ з антибактеріальними властивостями, зокрема метилглюксалем [7].

Підсумовуючи наведені результати, можна стверджувати, що клітинні культури являють собою стандартну модель у біомедичних дослідженнях *in vitro*. Вони дозволяють провести комплексне вивчення клітинних механізмів як у фізіологічних, так і в експериментальних умовах, не використовуючи лабораторних тварин [13]. Тестування методом МТТ та з використанням барвника нейтрального червоного базуються

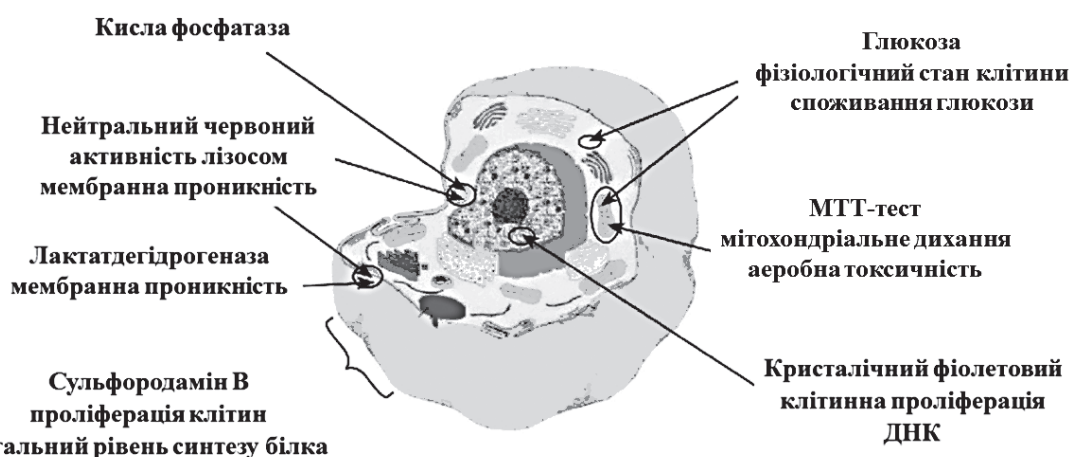
на вивченні метаболічних шляхів цитотоксичного впливу фармацевтичних препаратів у доклінічних дослідженнях. Залежно від методу, який використовують, можна дослідити, на яку ланку метаболізму впливає той чи інший препарат, що добре демонструє Рис. 4.

Літературні дані щодо досліджень безпечності розчинів для ПД свідчать про цитотоксичність цих розчинів, зумовлену впливом комбінації чинників, зокрема кислим значенням рН (5–6), наявністю ПДГ, високим вмістом глюкози та натрію лактату, високою осмолярністю цих розчинів [8-10, 22].

Висновки

Для вивчення біосумісності розчинів для ПД з очеревиною проводяться численні дослідження, серед яких є поширеними дослідження з вивчення життєздатності клітин за МТТ-тестом та тестом з нейтральним червоним. Літературні дані свідчать, що традиційні розчини для ПД мають низьку біосумісність через високі значення вмісту глюкози, лактату, ПДГ і осмолярності та низьке значення рН. Однак важко сказати, до якої міри біонесумісність приписується кожному чиннику окремо або комбінації чинників. Наші дослідження підтвердили гіпотезу про негативний вплив низьких значень рН, високого вмісту глюкози, натрію лактату та підвищеної осмолярності на біосумісність розчинів *in vitro*, оскільки життєздатність клітин лінії Vero у присутності ізотонічного розчину натрію хлориду була суттєво вищою: 24.69 % порівнюючи з розчинами для ПД різного складу (11.86 – 16.08) %. Також було встановлено коефіцієнт кореляції 0.31 (найбільше значення серед усіх визначених) між підвищенням життєздатності клітин

Рисунок 4



Біологічні тест-системи, як використовують для визначення цитотоксичної дії фармацевтичних препаратів (за даними «MQA Laboratories / Molecular Cell Biology & Virology Testing / Cytotoxicity / Cell Culture / Cell Line Generation»)

і збільшенням рН розчину після стерилізації, тимчасом коефіцієнт кореляції між зниженням життєздатності клітин і збільшенням оптичної густини розчину при 228 нм після стерилізації становив 0.202.

Співавтор Наталія Гудзь вдячна Міжнародному вишеградському фонду (контракт № 51700107) за надання стипендії для проведення досліджень, пов'язаних із розчинами для діалітичної терапії.

ЛИТЕРАТУРА

- 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation products in fluids for peritoneal dialysis / T. Linden, A. Conen, R. Deppisch et al. // *Kidney Int.* — 2002. — № 2. — P. 697-703.
- PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization / M. Erixon, T. Linden, P. Kjellstrand et al. // *Perit. Dial. Int.* — 2004. — № 4. — P. 392-398.
- Take care in how you store your PD fluids: actual temperature determines the balance between reactive and non-reactive GDPs / M. Erixon, A. Wieslander, T. Linden et al. // *Perit. Dial. Int.* — 2005. — № 6. — P. 583-590.
- Cytotoxic Glucose Degradation Products in Fluids for Peritoneal Dialysis / Adib N., Shekarchi M., Hajimehdipour H. et al. // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* — 2011. — Vol. 10, № 1. — P. 113-117. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869589/pdf/ijpr-10-113.pdf> (accessed 26.12.2015).
- Influence of bicarbonate / low-GDP peritoneal dialysis fluid (Bicavera) on *in vitro* and *ex vivo* epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells / A. Fernández-Perpén, M.L. Pérez-Lozano, M.-A. Bajo et al. // *Perit. Dial. Int.* — 2012. — № 3. — P. 292-304; DOI: 10.3747/pdi.2010.00315.
- Effects of low-glucose degradation product solution on peritoneal membrane characteristics in peritoneal dialysis patients: a 3-year Follow-up study / J.W. Park, S.H. Kang, J.Y. Do // *Iranian journal of Kidney Diseases.* — 2014. — № 1 (Vol. 8). — P. 58-64.
- The association between glucose exposure and the risk of peritonitis in peritoneal dialysis patients / A.T.N. Diepen, S. Esch, D. Struijk, R. Krediet // *Perit. Dial. Int.* — 2016. — Vol. 36. — P. 533-539.
- PD solutions: new and old / J.A. Diaz-Buxo, D.-A. Sawin, R. Himmele // *Dialysis and Transplantation.* — 2011. — P. 356-361. DOI: 10.1002/dat.20601.
- A peritoneal dialysis regimen low in glucose and glucose degradation products results in increased cancer antigen 125 and peritoneal activation / C.Y. Poole, A.G.A. Welten, P.M. Wee et al. // *Perit. Dial. Int.* — 2012. — Vol. 32. — P. 305-315.
- Ortiz A., Santamaria B., Montenegro J. (2011). Biocompatible Solutions for Peritoneal Dialysis, *Progress in Peritoneal Dialysis*, Dr. Ray Krediet (Ed.), ISBN: 978-953-307-390-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-peritoneal-dialysis/biocompatible-solutions-for-peritonealdialysis>.
- Mesothelial toxicity of peritoneal dialysis fluids is related primarily to glucose degradation products, not to glucose per se / J. Witowski, T. Bender, J. Wisniewska et al. // *Perit. Dial. Int.* — 2003. — Vol. 23, № 4. — P. 381-390.
- Tweedale A.C. Uses of «Good Laboratory Practices» by regulated industry and agencies and the safety of bisfenol // *J. Epidemiol. Community Health.* — 2011. — № 65 (6). — P. 475-476. DOI: 10.1136/jech.2010.127761.
- Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. — СПб.: Морсар АВ, 2003. — 239 с.
- Гудзь Н.И. Обоснование состава перитонеальных диализных глюкозосодержащих растворов // *Вестник фармации.* — 2015. — № 2 (68). — С. 33-40.
- Гудзь Н.И. Спектрофотометрический анализ в разработке перитонеальных диализных растворов // *Вестник фармации.* — 2015. — № 4. — С. 63-70.
- Scudiero D. et al. Evaluation of a Soluble Tetrasolium / Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in Culture using human and other cell lines // *Cancer Res.* — 1988. — V. 48. — P. 4827-4833.
- SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей / А. Биюль, П. Цефель. — Москва — Санкт-Петербург — Киев: Торг.-изд. дом DiaSoft, 2005.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия; пер. с англ.; под ред. В.В. Португалова. — М.: Мир, 1969. — 645 с.
- Hanrahan C.T. The challenges of heat sterilization of peritoneal dialysis solutions: is there an alternative? / C.T. Hanrahan, R. Himmele, J.A. Diaz-Buxo // *Adv. Perit. Dial.* — 2012. — Vol. 28. — P. 126-130.
- Гудзь Н.І. Вивчення фізико-хімічних властивостей глюкозогідрокарбонатних перитонеальних діалітичних розчинів // *Фармацевтичний журнал.* — 2008. — № 6. — С. 68-74.
- Гудзь Н.И. К вопросу о механизме деградации глюкозы в перитонеальных диализных растворах // *Рецепт.* — 2014. — № 4. — С. 93-103.
- Structure- and Concentration-Specific Assessment of the Physiological Reactivity of α -Dicarbonyl Glucose Degradation Products in Peritoneal Dialysis Fluids / L. Distler, A. Georgieva, I. Kenkel, J. Huppert and M. Pischetsrieder // *Chem. Res. Toxicol.* — 2014. — № 27. — P. 1421-1430. [https:// dx.doi.org/10.1021/tx500153n](https://dx.doi.org/10.1021/tx500153n).
- Deciphering the contribution of biofilm to the pathogenesis of peritoneal dialysis infections: characterization and microbial behavior on dialysis fluids / J. Sampaio., S. Machado, A.M. Gomes et al. // *PLOS ONE.* — 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0157870.

УДК 576.3:615.451.13:542.64

Гудзь Н. И., Кобылинская Л. И., Филипская А. М., Лагутина О. С., Дмытруха Н. М., Корытнюк Р. С.

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

ГУ «Институт медицины труда» НАМН Украины, Киев

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, Киев

Определение жизнеспособности клеток во время фармацевтической разработки растворов для перитонеального диализа

Для изучения биосовместимости растворов для перитонеального диализа (ПД) с брюшиной проводятся многочисленные исследования, среди которых распространены исследования по определению жизнеспособности клеточных линий с нейтральным красным и МТТ-тестом. Литературные данные свидетельствуют, что традиционные растворы для ПД имеют низкую биосовместимость из-за высоких значений содержания глюкозы, натрия лактата, продуктов деградации глюкозы (ПДГ) и осмолярности и низких значений рН. Однако остается неясным, насколько биосовместимость присуща каждому фактору отдельно или их комбинации. Наши исследования подтвердили гипотезу о негативном влиянии комплекса факторов при кислых значениях рН (5.11–5.77), ПДГ, высоком содержании глюкозы, натрия лактата и повышенной осмолярности на биосовместимость растворов *in vitro*. Так, жизнеспособность клеток почки обезьяны линии Vero в присутствии изотонического раствора натрия хлорида (24.69 %) была выше по сравнению с растворами для ПД разного состава

(11.86 – 16.08) %. Установлено високе значення коефіцієнта кореляції 0.31 между ростом жизнеспособности и увеличением pH раствора после стерилизации, которое с позиции статистики характеризует корреляционную связь между величинами как слабую. Коэффициент корреляции между уменьшением жизнеспособности и увеличением оптической плотности раствора после стерилизации при 228 нм был установлен как 0.202, что с позиции статистики характеризует корреляционную связь между величинами также как слабую. Данные исследований показывают, что при разработке технологии растворов для ПД необходимо достичь баланса между pH раствора до и после стерилизации и степенью деградации глюкозы.

Ключевые слова: растворы для перитонеального диализа, жизнеспособность клеток, МТТ-тест, культура клеток линии Vero.

Соавтор Наталия Гудзь благодарна Международному вышеградскому фонду (контракт № 51700107) за предоставление стипендии для проведения исследований, связанных с растворами для диализной терапии.

UDC 576.3:615.451.13:542.64

Hudz N. I., Kobylinska L. I., Filipiska A. M., Lagutina O. S., Dmytruha N. M., Korytniuk R. S. Danylo Halytsky Lviv National Medical University Institute for Occupational Health of National Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv Shupryk National Medical Academy of postgraduate education, Kyiv

Determination of cell viability during pharmaceutical development of solutions for peritoneal dialysis

For studying the biocompatibility of solutions for peritoneal dialysis (PD) with the peritoneum, numerous studies are conducted, among which studies are widely conducted for determination of the viability of cell lines with neutral red and МТТ-test. The literature data indicate that traditional solutions for PD have low biocompatibility due to high glucose, sodium lactate, glucose degradation products (GDP), and osmolarity and low pH values. However, it remains unclear how much biocompatibility is attributed to each factor or their combination. Our studies confirmed the hypothesis of the negative effect of the complex of factors: acid pH (5.11 – 5.77), GDP, high glucose, sodium lactate and an increased osmolarity on the biocompatibility of solutions in vitro as the viability of Vero monkey kidney cells in the presence of isotonic sodium chloride solution (24.69%) was higher in comparison with solutions for PD of different composition (11.86 – 16.08) %. The largest value of the correlation coefficient 0.31 between the growth of viability and the increase in the pH of the solutions after ster-

ilization was established, which from the position of statistics characterizes this correlation relation between the quantities as weak. The correlation coefficient between the decrease of the viability and the increase of the absorbance of the solutions after sterilization at 228 nm was established as 0.202, which from the position of statistics characterizes the correlation relationship between the values as well as the weak correlation. The research data show that when developing the technology for solutions for PD, it is necessary to achieve a balance between the pH of the solution before and after sterilization and the degree of glucose degradation.

Keywords: solutions for peritoneal dialysis, cell viability, МТТ-test, cell culture of the Vero line.

Co-author Natalia Hudz is grateful to the International Visegrad Fund (contract No. 51700107) for providing scholarship for studies related to solutions for dialysis therapy.

Гудзь Наталя Іванівна. Доцент кафедри технології ліків та біофармації Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (2008). К. фарм. н. (2002).

Кобилінська Леся Іванівна. Доцент кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (2006). К. мед. н. (2002).

Філіпська Анна Михайлівна. Асистент кафедри технології ліків та біофармації Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (2015).

Дмитруха Наталя Миколаївна. Д. б. н. (2011), провідний наук. співроб. лабораторії промислової токсикології та гігієни при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці» НАМН України.

Лагутіна Ольга Сергіївна. Мол. наук. співроб. лабораторії промислової токсикології та гігієни при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці» НАМН України.

Коритнюк Раїса Сергіївна. Професор кафедри фармацевтичної технології ліків та біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти (1994). Д. фарм. н. (1992).

УДК 615.23:615.451.16

Кишинець Н. В., Маслова Н. Ф.

ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»

Вивчення впливу препарату «Бронхофіт», настойка складна, на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи щурів в умовах експериментального альвеоліту

У роботі наведено результати дослідження впливу препарату «Бронхофіт», настойка складна, виробництва ТОВ «НВФК "ЕЙМ"» на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи щурів порівнюючи з препаратом порівняння «Бронхікум[®]», еліксир, виробництва фірми Nattermann (Німеччина) в умовах експериментального альвеоліту, викликаного інтратрахеальним введенням кобальту хлориду у дозі 2.5 мг/кг.

Встановлено, що інтратрахеальне введення кобальту хлориду викликає розвиток гострого альвеоліту, про що свідчило значне зростання абсолютної та відносної маси легенів щурів, зміна клітинного складу лаважу: збільшення загальної кількості клітин бронхоальвеолярного змиву, порушення співвідношення клітин у бік збільшення вмісту вільних альвеолярних макрофагів і зменшення кількості лімфоцитів та макрофагів-моноцитів та зміна гістоструктури легенів і бронхів щурів. При введенні у лікувально-профілактичному режимі у дозі 1 мл/кг препарат «Бронхофіт», настойка складна, виявляє пневмопротекторну дію, про що свідчить зменшення значною мірою проявів гострого токсичного альвеоліту та відновлення структурно-функціональних показників бронхолегеневої системи. За деякими показниками (альвеолярні макрофаги, макрофаги-моноцити та фосфоліпіди) препарат «Бронхофіт», настойка складна, перевищує препарат порівняння «Бронхікум[®]», еліксир.

Ключові слова: «Бронхофіт», настойка складна, бронхолегенева система, експериментальний альвеоліт, пневмопротекторна дія, фармакологія, щури, кобальту хлорид.

У наш час однією з актуальних проблем фармакології є пошук нових ефективних лікарських засобів для патогенетичної терапії гострих і хронічних захворювань легенів, що мають не тільки секретолітичний, бронхолітичний та протикашльовий ефекти, але й протекторну дію щодо сурфактантної системи легенів.

Респіраторні захворювання є найчастішою причиною звернення за лікарською допомогою. За даними дослідження споживчого ринку, за осінньо-зимовий період близько 80 % українців переносять застудні захворювання [1]. Найбільш характерним симптомом для цієї групи захворювань, безсумнівно, є кашель. Цю захисну реакцію, завдяки якій очищуються дихальні шляхи, можуть викликати різні причини: вади розвитку бронхів і легенів, бронхіальна астма, чужорідні тіла, проблеми з серцево-судинною та шлунково-кишковою системами [2]. Кашель є найпоширенішим симптомом, що спостерігається при первинній медичній допомозі [3, 4], а хронічний кашель є однією з найчастіших причин для нових звернень до спеціалістів-пульмонологів [5]. Поширеність хронічного кашлю (тривалістю понад вісім тижнів) становить від 10 % до 30 % [6, 7]. Наявність хронічного кашлю несприятливо впливає на якість життя, пов'язану зі здоров'ям [8-10], а успішне лікування часто значно його поліпшує [8, 9]. Однак найчастіше кашель супроводжує саме запальні захворювання, викликані інфекціями дихальної системи. Кашель може становити серйозну проблему, якщо виведен-

ню бронхіального секрету перешкоджають його властивості та стан дихальних шляхів [2]. Бронхіальний секрет — це складний комплекс, який складається з секрету бронхіальних залоз і келихоподібних клітин, поверхневого епітелію, продуктів метаболізму рухливих клітин, альвеолярного сурфактанту, тканинного трансудату [11]. Складний за складом бронхіальний секрет продукується кількома видами клітин. Келихоподібні клітини, що знаходяться переважно в екстраторакальній частині трахеї, виділяють слизовий секрет. Секреторні клітини Клара, найчисельніші в дрібних бронхах і бронхіолах, синтезують фосфоліпіди та бронхіальний сурфактант; альвеолярні пневмоцити II типу — альвеолярний сурфактант, що необхідний для підтримки поверхневого натягу альвеол і видалення з них сторонніх частинок. По всій поверхні слизової оболонки трахеобронхіального дерева розташовані плазматичні клітини, які продукують імуноглобуліни, що запобігають фіксації бактеріальних токсинів і проникненню їх углиб бронхіальної стінки. При цьому мікроорганізми аглютинуються мокротинням та елімінуються разом з ним [11].

Відомо, що у забезпеченні нормального функціонування альвеолярного апарату легень та ефективного газообміну велике значення відводиться сталості хімічного складу та структурованості легеневого сурфактанту. Арсенал препаратів, що мають протекторну дію щодо сурфактантної системи легень, невеликий, тому доцільним є пошук нових лікарських засобів

із зазначеним ефектом. У зв'язку з цим досліджено вплив препарату «Бронхофіт», настойка складна, виробництва ТОВ «НВФК "ЕЙМ"» на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи щурів в умовах експериментального альвеоліту, викликаного інтоксикацією кобальту хлоридом.

Мета роботи

Вивчення впливу препарату «Бронхофіт», настойка складна, виробництва ТОВ «НВФК "ЕЙМ"» на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи щурів порівнюючи з препаратом порівняння «Бронхікум[®]», еліксир, виробництва фірми Nattermann (Німеччина).

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на базі ДП «ДНЦЛЗ» на білих щурах-самках лінії Вістар масою 150-180 г. Досліди були виконані згідно з Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою. Дослідний препарат «Бронхофіт», настойка складна, — це складна настойка із суміші лікарської рослинної сировини (аіру коренів (*Calami radix*), алтеї коренів (*Althaeae radix*), липи квіток (*Tiliae flos*), нагідок квіток (*Calendulae flos*), солодки коренів (*Liquiritiae radix*), шавлії лікарської листя (*Salviae officinalis folium*), бузини квіток (*Sambuci flos*), кропиви листя (*Urticae folium*), м'яти перцевої листя (*Menthae piperitae folium*), чебрецю повзучого трави (*Serpylli herba*), оману коренів (*Inulae helenii radix*), ромашки квіток (*Matricariae flos*) (екстрагент — етанол 40%). Як препарат порівняння використовували «Бронхікум[®]», еліксир, який був близький за фармакологічними властивостями до дослідного препарату, але відрізнявся за складом та містив настойку чебрецю, настойку гринделії (трава), настойку польового цвіту (коріння), настойку первоцвіту (коріння), настойку квебрахо (кора). Гострий токсичний альвеоліт викликали шляхом інтратрахеального введення кобальту хлориду (CoCl_2) у дозі 2.5 мг/кг [12]. Тварини були розділені на такі експериментальні групи по 12 щурів у кожній: група № 1 — контрольна патологія, тварини з експериментальним альвеолітом; група № 2 — тварини з експериментальним альвеолітом, яким у лікувально-профілактичному режимі вводили препарат «Бронхофіт», настойка складна, у дозі 1 мл/кг; група № 3 — тварини з експериментальним альвеолітом, яким у лікувально-профілактичному режимі вводили препарат «Бронхікум[®]», еліксир, у дозі 1 мл/кг; група № 4 — контрольна група,

тваринам якої вводили розчинник (воду очищену) у дозі 1 мл/кг. На 8-й день після інсталяції кобальту з кожної групи брали по 6 тварин для дослідження фосфоліпідів сурфактанту. Лаваж отримували триразовим промиванням легень забуференим (5 мМ трис-НСІ, рН 7.4) холодним фізіологічним розчином порціями по 4 мл. Для видалення клітин змиви об'єднували та центрифугували за швидкості 300 г протягом 10 хв. Загальну концентрацію фосфоліпідів обчислювали за вмістом ліпідного фосфору. Кількість клітин дихальних шляхів у лаважі підраховували в камері Горяєва. Диференціальну оцінку клітин дихальних шляхів визначали в мазках, фарбованих за Романовським — Гімзою.

Легені тварин, що лишилися, по 6 тварин з кожної групи, досліджували патоморфологічно (дане дослідження проведене за участі співробітників сектора патоморфології лабораторії лікарської та промислової токсикології ДП «ДНЦЛЗ»).

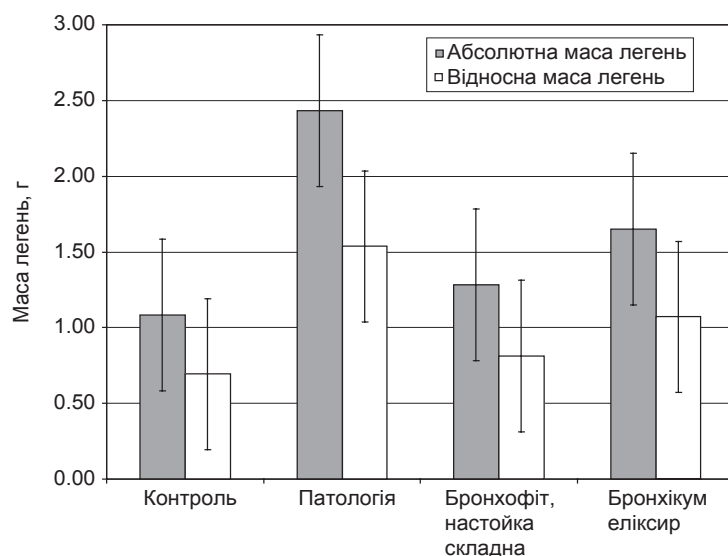
Результати досліджень наведено у формі середнього значення показника (\bar{X}) та їх стандартного відхилення ($S_{\bar{x}}$). Статистичну обробку проводили методом варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента. Міжгрупові відмінності вважали значущими за умови $p \leq 0.05$ (рівень значущості не менше 95 %).

Результати досліджень

Встановлено, що інтратрахеальне введення кобальту хлориду викликає розвиток гострого альвеоліту, про що свідчило значне зростання абсолютної та відносної маси легень щурів (Рис. 1).

Так, зокрема, було встановлено, що через сім діб після дії хлориду кобальту абсолютна маса легень щурів групи патології (№ 1) склала в середньому 2.5 ± 0.11 г, що на 124.6 % перевищує аналогічний показник у контрольній групі (№ 2), абсолютна маса легень у якій склала 1.1 ± 0.07 г. Збільшення відносної маси легень щурів групи патології склало також близько 120 % (123.2 %) порівнюючи з контролем і дорівнювало в середньому 1.5 ± 0.06 г, у той час як відносна маса легень останніх склала в середньому 0.7 ± 0.04 г (Рис. 1). Ці зміни можуть свідчити про розвиток значного інтерстиціального набряку в наслідок підвищення проникності капілярів. Згідно з літературними даними, ці зміни характерні для уражень, викликаних саме сполуками кобальту, при яких спостерігається повнокров'я внутрішніх органів з різким ураженням капілярів, навколосудинний набряк та крововиливи [12-15].

Рисунок 1



Вплив препарату «Бронхофіт», настойка складна, на абсолютну та відносну масу легень щурів з альвеолітом

Таблиця 1

Вплив препарату «Бронхофіт», настойка складна, на загальну кількість клітин та на їх диференціальне співвідношення в бронхоальвеолярному змиві щурів з альвеолітом

Дослідна група	Кількість клітин у 1×10 г легені	Альвеолярні макрофаги	Лімфоцити	Макрофаги-моноцити
Група 1 (патологія)	$2.7 \pm 0.22^{**}$	$66.8 \pm 4.64^{**}$	$12.0 \pm 2.34^{**}$	$21.2 \pm 3.69^{**}$
Група 2 «Бронхофіт», настойка складна»	$1.9 \pm 0.10^*$	$25.0 \pm 3.66^{*****}$	$42.3 \pm 3.40^{***}$	$32.7 \pm 3.20^{****}$
Група 3 «Бронхікум®», еліксир	2.0 ± 0.20	$39.8 \pm 3.16^{***}$	$36.8 \pm 2.96^{***}$	$23.3 \pm 1.05^{**}$
Група 4 (контроль)	$1.5 \pm 0.14^*$	$8.2 \pm 0.95^*$	$60.8 \pm 2.60^*$	$31.0 \pm 2.42^*$

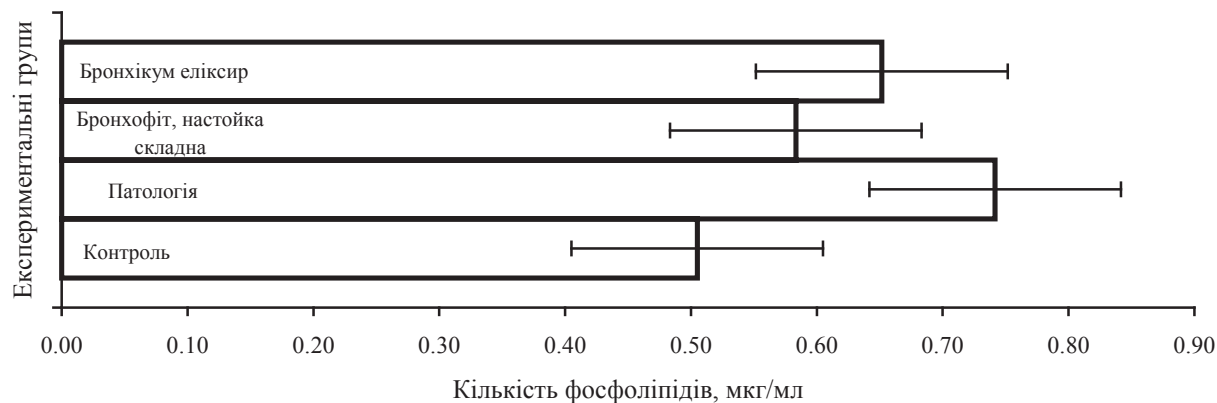
Примітки:

* — $p \leq$ щодо групи патології (критерій);

** — $p \leq$ щодо групи контролю (критерій);

*** — $p \leq$ «Бронхофіт», настойка складна, щодо «Бронхікум®», еліксир.

Рисунок 2



Вплив препарату «Бронхофіт», настойка складна, на кількість фосфоліпідів у бронхоальвеолярному змиві щурів з альвеолітом

Під час дослідження клітин бронхоальвеолярного змиву в мазку було відзначено значне збільшення їх кількості порівнюючи з групою № 2 (контроль). Кількість клітин збільшилася майже вдвічі (на 78.7 %) та склала в середньому 2.7 ± 0.22 у перерахунку на 1×10^6 г легень, тоді як загальна кількість клітин бронхоальвеолярного змиву групи № 2 дорівнювала в середньому 1.5 ± 0.14 у перерахунку на 1×10^6 г легень (Табл. 1). Порівнюючи з контролем змінився і клітинний склад лаважу: відбулось збільшення загальної кількості клітин бронхоальвеолярного змиву, порушення співвідношення клітин у бік збільшення вмісту вільних альвеолярних макрофагів і зменшення кількості лімфоцитів та макрофагів-моноцитів (Табл. 1). Також збільшилась на 45 % загальна кількість фосфоліпідів у лаважі (Рис. 2).

Під час мікроскопічного дослідження гістоструктури легенів і бронхів щурів через 7 діб після впливу кобальту хлориду виявлено потовщення міжальвеолярних перетинок за рахунок проліферації макрофагів, десквамацію альвеолоцитів, дистелектаз та ателектаз зі значним вмістом макрофагів, збільшення периваскулярної лімфоїдної інфільтрації, що дозволяє класифікувати процес за патоморфологічними ознаками як підгострий фіброзний альвеоліт.

При введенні у лікувально-профілактичному режимі препаратів «Бронхофіт», настойка складна, та «Бронхікум[®]», еліксир, було встановлено, що значною мірою зменшуються наведені вище прояви гострого токсичного альвеоліту. Як видно з Рис. 1, знижується абсолютна та відносна маса легень до значень, близьких до фізіологічного контролю: абсолютна маса легень у тварин, яких лікували препаратами «Бронхофіт», настойка складна, та «Бронхікум[®]», еліксир, перевищувала масу легень контрольних тварин на 18.5 % та 52.8 % відповідно; відносна маса — на 17.4 % та 55.1 % відповідно. Також спостерігалась значна нормалізація загальної кількості фосфоліпідів у змиві порівнюючи з патологією (Рис. 2), зменшення загальної кількості клітин бронхоальвеолярного лаважу та зменшення кількості альвеолярних макрофагів (Табл. 1). Відзначалися деякі відмінності в інтенсивності впливу препаратів на окремі досліджувані структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи: зокрема, кількість макрофагів-моноцитів та фосфоліпідів у лаважі щурів з гострим токсичним альвеолітом, яких лікували препаратом «Бронхофіт», настойка складна, майже досягла рівня фізіологічного контролю, на відміну від щурів, яких лікували препаратом «Бронхікум[®]», еліксир, та відріз-

нялась від контролю на 5.4 % (для макрофагів-моноцитів) та на 13.7 % (для фосфоліпідів). Спостерігалися незначні відмінності в інтенсивності прояву патоморфологічних ознак гострого альвеоліту в експериментальних групах, яких лікували цими препаратами.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що препарат «Бронхофіт», настойка складна, в умовах експериментального альвеоліту, викликаного інтратрахеальним введенням кобальту хлориду, має пневмопротекторну дію і за деякими показниками (альвеолярні макрофаги, макрофаги-моноцити та фосфоліпід) перевищує препарат порівняння «Бронхікум[®]», еліксир.

Висновки

1. Під впливом препаратів «Бронхофіт», настойка складна, та «Бронхікум[®]», еліксир, у дозі 1 мл/кг на моделі експериментального альвеоліту, викликаного інтоксикацією кобальту хлоридом, знижується абсолютна та відносна маса легень до значень фізіологічного контролю, що свідчить про однаковий фармакологічний ефект досліджуваних препаратів.

2. Препарат «Бронхофіт», настойка складна, на моделі патології у зазначеній дозі виявляє позитивну дію на структурно-функціональні показники бронхолегеневої системи, нормалізуючи загальну кількість фосфоліпідів у змиві, кількість макрофагів-моноцитів, альвеолярних макрофагів, лімфоцитів та загальну кількість клітин в бронхіальному змиві.

3. Під впливом препарату порівняння «Бронхікум[®]», еліксир, також спостерігається відновлення структурно-функціональних показників бронхолегеневої системи, проте кількість фосфоліпідів та альвеолярних макрофагів не досягає рівня фізіологічного контролю, перевищуючи його на 32 % (фосфоліпід) та майже в 5 разів (альвеолярні макрофаги).

ЛІТЕРАТУРА

1. Сергиенко О.М. Изучаем выбор современного потребителя / Сергиенко О.М. // Еженедельник Аптека. — 07.05.2012 г. — № 18 (839). — С. 10-11.
2. Купко Н. Применение муколитического препарата ацетилцистеина во врачебной практике: часто возникающие вопросы / Купко Н. // Рациональная фармакотерапия. — 2015. — № 1 (34). — С. 52-56.
3. Morice AH Epidemiology of cough / Morice AH // Pulm Pharmacol Ther. — 2002. — 15. — P. 253-259.
4. Adams RJ Associations of physical and mental health problems with chronic cough in a representative population cohort./ Robert J Adams, Sarah L Appleton, David H Wilson, Anne W Taylor, Richard E Ruffin1 // Cough. — 2009. — 5. — P.10.
5. Irwin RS The diagnosis and treatment of cough / Irwin RS, Madison JM // N Engl J Med. — 2000. — 343. — P. 1715-1721.

6. Chung KF Chronic Cough 1: Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough / Chung KF, Pavord ID // *Lancet*. — 2008. — 371. — P. 1364-1374.
7. Janson C Prevalence and diagnosis of chronic respiratory symptoms in adults / Janson C, Littlejohns P, Ebrahim S, Anderson R // *Br Med J*. — 1989. — 298. — P. 1556-1560.
8. French CL Impact of chronic cough on quality of life / French CL, Irwin RS, Curley FJ, Krikorian CJ // *Arch Intern Med*. — 1998. — 158. — P. 1657-1661.
9. French CT Evaluation of a cough specific quality of life questionnaire / French CT, Irwin RS, Fletcher KE, Adams TM // *Chest*. — 2002. — 121. — P. 1123-1131.
10. Birring SS Development of a symptom specific health status measure for patients with chronic cough / Birring SS, Prudon B, Carr AJ, Singh SJ, Morgan MD, Pavord ID // *Leicester Cough Questionnaire (LCQ). Thorax*. — 2003. — 58. — P. 339-43.
11. Маев И.В. Муколитические средства в терапии хронической обструктивной болезни легких / Маев И.В., Бусарова Г.А. // *Лечащий врач*. — 2003. — № 1 (3). [Электронный ресурс] URL: <http://www.lvrach.ru/2003/01/4530016/>
12. Nemery B Lung injury induced by paraquat, hyperoxia and cobalt chloride Effects of ambroxol / Nemery B, Vanlommel S, Verbeke EK, Lauwerynsa JM, Demedtsa M // *Pulmonary Pharmacology*. — 1992. — V.5. — Is. 1. — P. 53-60.
13. Lison D Experimental research into the pathogenesis of cobalt/hard metal lung disease / Lison D, Lauwerys R., Demedts M, Nemery B. // *Eur Respir J*. — 1996. — 9. — P. 1024–1028.
14. Balmes JR. Respiratory effects of hard metal dust exposure / Balmes JR. // *Occup Med State of the Art Reviews*. — 1987. — 2. — P. 327–344.
15. Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract / Nemery B. // *Eur Respir J*. — 1990. — 3. — P. 202–219.

УДК 615.23:615.451.16

Резюме

Кишинец Н. В., Маслова Н. Ф.

ГП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения»

Изучение влияния препарата «Бронхофит», настойка сложная, на структурно-функциональные показатели бронхолегочной системы крыс в условиях экспериментального альвеолита

В работе приведены результаты исследования влияния препарата «Бронхофит», настойка сложная, производства ООО «НПФК “ЭЙМ”» на структурно-функциональные показатели бронхолегочной системы крыс по сравнению с препаратом сравнения «Бронхикум[®]», эликсир, производства фирмы Nattermann (Германия) в условиях экспериментального альвеолита, вызванного интратрахеальным введением кобальта хлорида в дозе 2.5 мг/кг.

Установлено, что интратрахеальное введение кобальта хлорида вызывает развитие острого альвеолита, о чем свидетельствовал значительный рост абсолютной и относительной массы легких крыс, изменение клеточного состава лаважа: увеличение общего количества клеток бронхоальвеолярного смыва, сдвиг соотношения клеток в сторону увеличения содержания свободных альвеолярных макрофагов и уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов-моноцитов, а также изменение гистоструктуры легких и бронхов крыс. При введении в лечебно-профилактическом режиме в дозе

1 мл/кг препарат «Бронхофит», настойка сложная, обладает пневмопротекторным действием, о чем свидетельствует уменьшение в значительной степени проявлений острого токсического альвеолита и восстановление структурно-функциональных показателей бронхолегочной системы. По некоторым показателям (альвеолярные макрофаги, макрофаги-моноциты и фосфолипиды) препарат «Бронхофит», настойка сложная, превышает препарат сравнения «Бронхикум[®]», эликсир.

Ключевые слова: «Бронхофит, настойка сложная», бронхолегочная система, экспериментальный альвеолит, пневмопротекторное действие, фармакология, крысы, кобальта хлорид.

UDC 615.23:615.451.16

Summary

Kyshynets N. V., Maslova N. F.

State Enterprise «State Scientific Center for Drugs and Medical Devices», Kharkiv, Ukraine

State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines», Kharkiv, Ukraine

Study of the effect of the preparation «Bronhofit, tincture complex» on the structural and functional parameters of the bronchopulmonary system of rats under conditions of experimental alveolitis

The results of the study of the effect of the herbal drug «Bronhofit, tincture complex», manufactured by «Research&Production Pharmaceutical Company» AIM» LLC (Ukraine) on the structural and functional parameters of the bronchopulmonary system of rats compared with the preparation «Bronchikum[®], elixir» produced by the company Nattermann (Germany) in conditions of experimental alveolitis caused by intratracheal administration of cobalt chloride in a dose of 2.5 mg/kg.

It has been established that intratracheal administration of cobalt chloride causes the development of acute alveolitis, as evidenced by the significant increase in absolute and relative mass of lung in rats, the change in cellular composition of lavage: an increase in the total number of bronchoalveolar erosion cells, a shift in cell ratios towards increasing the content of free alveolar macrophages and reducing the number of lymphocytes and macrophage monocytes, and a change in the histostructure of the lung and bronchial rats. The herbal drug «Bronhofit, tincture complex» after injection of 1 ml/kg for prophylactic and therapeutic treatments, has a pneumoprotective effect, as evidenced by a significant decrease in the manifestations of acute toxic alveolitis and the restoration of structural and functional parameters of the bronchopulmonary system.

According to some indicators (alveolar macrophages, macrophage monocytes and phospholipids) the preparation «Bronhofit, tincture complex» exceeds the comparator preparation «Bronchikum[®], elixir».

Key words: «Bronhofit, tincture complex», bronchopulmonary system, experimental alveolitis, pneumoprotective effect, pharmacology, rats, cobalt chloride.

Кишинець Неля Віталіївна. Старш. наук. співроб. відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Маслова Наталія Федорівна. Вчений секретар ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», д. б. н. (1994), професор (2000), ORCID ID 0000-0001-8094-7998.

Аналітичний огляд

УДК 615.456.07

Меркулова Ю. В.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Пірогенна реакція та пірогени як складова проблеми безпечності парентеральних препаратів

Стаття містить огляд літератури щодо проблеми пірогенної забрудненості парентеральних лікарських засобів, механізму реалізації токсичної дії пірогенів і клінічної симптоматики «ендотоксинової агресії» у людини. Основна причина пірогенності лікарських засобів — ендотоксини (ліпополісахариди) грамнегативних бактерій, які не піддаються стандартним методам стерилізації, викликаючи в організмі низку тяжких патологічних ефектів аж до летальності. Наведені сучасні дані стосовно хімічного складу, просторової тривимірної структури, фізико-хімічних властивостей і патофізіологічних ефектів ліпополісахаридів. Проаналізована група неендотоксिनних пірогенів (ліпотьєхосва кислота, фунгальні β -глюкани, пептидоглюкани, віруси, водорості, синтетичні ад'юванти тощо), які на теперішній час привертають увагу, головним чином, як потенційні пірогенні домішки фармацевтичних препаратів.

Ключові слова: пірогенна реакція, пірогени, бактеріальні ендотоксини.

Введення парентеральних препаратів може супроводжуватись побічною дією у вигляді пірогенної реакції, що характеризується підвищенням температури тіла, ознобом, іноді — розладом серцево-судинної діяльності з тяжкими патологічними наслідками [1].

Незадовільна якість води для ін'єкцій, високе забруднення сировини та повітря виробничих приміщень та неналежна депірогенізація є основними причинами потрапляння ендотоксинів в готову продукцію фармацевтичного підприємства. Ці фактори також позначаються на якості препаратів, які виготовлені *ex tempore* за умов аптек [1-3].

Новітнє виробництво біологічних та біотехнологічних матеріалів підвищує ризик їх пірогенної забрудненості і потребує найретельнішого моніторингу пірогенів через високу потенційну можливість наявності ліпополісахаридів бактеріального походження в живильних (культуральних) середовищах, системах експресії, клітинних культурах, трансгенах та безпосередньо в імунобіологічних препаратах [1].

Підвищення температури тіла, що спостерігається у відповідь на введення лікарського засобу, є пірогенною (лихоманковою) реакцією організму, так званою *істинною лихоманкою*. Слід відзначити, що підйом температури тіла може також спостерігатись під час інтенсивної роботи м'язів, за умов екзогенного перегрівання, при сонячному чи тепловому ударі [2, 4, 5]. Водночас причини та механізм підвищення температури тіла при пірогенній або при гіпертермічних реакціях, перегріванні, активній м'язовій роботі принципово різняться [2, 4, 5].

Пірогенна реакція (лихоманка, гарячка) — системна неспецифічна терморегуляторна реакція організму на дію пірогенних речовин

(пірогенів), яка характеризується тимчасовою перебудовою функції системи теплообміну і спрямована на підвищення температури тіла незалежно від температури навколишнього середовища [3, 4, 6-9].

Проблема пірогенності парентеральних лікарських засобів має давню історію: вже в 1865 р. *Billroth K. T.* звернув увагу на випадки підвищення температури тіла після введення ін'єкційних препаратів і в експерименті *in vivo* на собаках дійшов висновку, що причиною пірогенної реакції може бути як діюча речовина, так і розчинник, що використовується для виготовлення ін'єкційного препарату [10]. У 1866 р. *Frese I. N.* встановив [11], що ані кип'ятіння, ані фільтрація ін'єкційних розчинів не послаблює їх пірогенних властивостей.

Хоча пірогенна реакція належить до однієї з проблем патології, яка має довгу історію дослідження, етап глибокого вивчення хімічної природи і біологічних властивостей пірогенів, інтимних механізмів формування процесу лихоманки припадає на 50 — 70-і роки минулого століття. Роботи *Bennett I.J.* і *Beeson P. B.*, *Atkins E.*, *Wood W. B. Jr.*, *Snell E. S.* стали поштовхом для поглибленого аналізу і фактичної конкретизації захисних механізмів, які визначають біологічну сутність пірогенної реакції [12-15].

Досі не з'ясовано чи можна розглядати пірогенну реакцію як адаптаційний механізм, що виник у гомойотермних тварин в процесі еволюції. Хоча підвищення температури тіла сприяє бактеріостатичному і бактерицидному ефектам, стимулює специфічні та неспецифічні фактори системи імунобіологічного нагляду і активує стрес-реакцію, підсилюючи тим самим природну резистентність організму до бактеріальної інфекції, водночас таке функціональне

перевантаження органів і фізіологічних систем, які безпосередньо залучені в пірогенну реакцію, призводить до їх розладу й іноді — до тяжких патологічних змін і летальності [4, 16].

Пірогенна реакція, патогенез та клінічні прояви. На даний час відомо, що в основі пірогенної реакції лежить реакція гіпоталамічного центру терморегуляції на дію пірогенних речовин [4, 7, 9, 17].

Процес пірогенної реакції завжди протікає в три стадії: на *першій стадії* відзначається підвищення температури тіла, на *другій* — температура тримається на високих цифрах; на *третьій стадії* температура знижується до вихідного рівня [4, 7-9, 18-20].

На першій стадії розвитку пірогенної реакції пірогени взаємодіють зі специфічними рецепторами на мембрані нейронів «установчої точки» центру терморегуляції гіпоталамуса, внаслідок чого підвищується активність мембранозв'язаної фосфоліпази А₂ з наступним вивільненням арахідонової кислоти і циклооксигеназа-контрольованим утворенням простагландину Е₂ (ПГЕ₂), що є ключовим етапом розвитку пірогенної реакції [17, 21]. ПГЕ₂ через активацію аденілатциклази підвищує внутрішньоклітинний рівень вторинного посередника — циклічного 3',5'-аденозинмонофосфату (цАМФ), за участю якого змінюється межа чутливості терморегуляторного центру до температурних аферентних сигналів: активність холодочутливих нейронів медіальної преоптичної ділянки зростає, теплочутливих — зменшується, і механізми теплопродукції починають домінувати над ефективністю процесів тепловіддачі [18, 21, 22]. Інтеграція температурних сигналів формує в гіпоталамусі ефекторні імпульси, що проходять переважно по симпатичних нервах і регулюють інтенсивність периферичного кровообігу [4]. Наростаюча еферентна імпульсація нейронів заднього гіпоталамуса і ретикулярної формації стовбурової частини мозку ініціює синхронізацію скорочень окремих м'язових пучків скелетної мускулатури, що проявляється як м'язове тремтіння. Так званий «*скорочувальний*» *термогенез*, що включає терморегуляційний тонус, обумовлений збільшенням тонусу м'язів шиї, тулуба та кінцівок і зростанням їх теплопродукції, а також м'язове тремтіння, є одним з головних механізмів теплопродукції і підвищення температури тіла на початковому етапі пірогенної реакції. Поступово зростає доля утворення тепла за рахунок «*нескорочувального*» *термогенезу*, який активується завдяки значному посиленню симпатичного впливу на метаболічні процеси у м'язах, печінці, жировій

тканині й різкого зростання рівня тиреоїдних гормонів у крові [4].

З переходом на другу стадію пірогенної реакції, коли температура тіла досягає більш високої «установчої точки» і залишається сталою певний час, теплопродукція урівноважується з тепловіддачею [4, 9, 19, 21, 23]. Тривалість і динаміка цієї стадії пірогенної реакції визначаються рядом факторів, серед яких вирішальне значення має концентрація пірогенів і чутливість до них центрів терморегуляції, водночас на виразність підвищення температури впливають властивості макроорганізму: потужність системи віддачі тепла, надійність функціональної та трофічної іннервації, наявність в організмі енергетичного запасу [4, 7, 9, 24, 25].

Після припинення дії пірогенів на останній, третій, стадії пірогенної реакції продукція лейкоцитарних пірогенних цитокінів поступово знижується, в нейронах переднього гіпоталамуса пригнічується активність фосфоліпази А₂, циклооксигенази, цАМФ, зменшується вміст ПГЕ₂, що призводить до підвищення межі збудження холодочутливих рецепторів [9]. В результаті «установча точка» центру терморегуляції знижується, тепловіддача починає перевищувати теплопродукцію: посилюється шкірна вазодилатація, профузне потовиділення, розширюються кровоносні судини, падає артеріальний тиск, а отже й температура тіла знижується до фізіологічної норми [21, 26]. Різде зниження температури може призвести до тяжкого розладу серцево-судинної діяльності (аритмія, серцева недостатність, гіпо- і гіпертензивні реакції) аж до колапсу і летальності [4].

Розрізняють три ступеня прояву пірогенної реакції: *легкий* ступінь, який характеризується незначними суб'єктивними розладами і підвищенням температури тіла до 38 °С; при *середньому* ступені тяжкості реакції озноб і головний біль асоційовані з підйомом температури тіла до 39 °С; *тяжкий* ступінь пірогенної реакції супроводжується вираженим ознобом, блювотою, біллю в спині, ціанозом, задишкою, температура тіла зростає до 40 °С та вище [3].

У разі внутрішньосудинного введення пірогенних лікарських засобів людині латентний період — до маніфестації клінічних ознак пірогенної реакції — становить 45–90 хв [3, 26], за даними інших авторів — 15–40 хв [9], та в вдвічі довший у разі підшкірного введення [9].

У механізмі розвитку пірогенної реакції провідна роль належить пірогенним речовинам [1, 3, 25]. *Пірогени*, або *пірогенні речовини*, — сполуки, які потрапляють ззовні або утворюються

всередині організму і викликають лихоманку (пірогенну реакцію) [1, 3, 4, 17].

Слово «піроген» — грецького походження, «pyretos» — жар, «pyros» — вогонь; «pyrogenos» — той, що несе жар [3]. Вперше слово «піроген» вжив англійський фізіолог *Burdon-Sanderson J.* в 1876 р. стосовно речовин, що виділені з гниючого м'яса [28]; і тільки в 1923 р. *Seibert F. B.* запропонувала термін «пірогени», зазначивши, що це речовини бактеріального походження, які потрапляють з ін'єкційними розчинами в кровоносну систему і викликають лихоманку [29]. *Seibert F. B.* перша виявила відсутність кореляції між патогенними і пірогенними властивостями бактерій [29].

Пірогенні речовини поділяють на дві групи — *екзогенні* (бактеріальні і небактеріальні) і *ендогенні* (клітинно-тканьового походження). Екзогенні пірогени за механізмом дії є *первинними пірогенами* і, проникаючи в організм, ще не викликають пірогенної реакції, а тільки ініціюють цей процес, індукуючи власні клітини організму-хазяїна до продукції спеціальних білкових речовин — *вторинних пірогенів*, які зі свого боку впливають на механізми терморегуляції і призводять до пірогенної реакції [16, 26]. Вторинні пірогени (інтерлейкіни, інтерферон-альфа, альфа-фактор некрозу пухлин) утворюються в нейтрофільних лейкоцитах, моноцитах та інших фіксованих макрофагах [9, 17, 30, 31]. Найбільш вивченим є лейкоцитарний піроген, який продукується життєздатними нейтрофільними лейкоцитами [3, 32].

На цей час відомо, що властивості пірогена мають різні за походженням та досить різноманітні за хімічною будовою групи сполук, серед яких бактеріальні ендотоксини відіграють ключову роль у патогенезі пірогенної реакції, тому їх будова та властивості вивчені найбільш повно [2, 3, 33].

Бактеріальні ендотоксини, структура, фізико-хімічні властивості, патофізіологічні ефекти. *Бактеріальні ендотоксини* — основні компоненти зовнішньої мембрани клітинної оболонки грамнегативних бактерій — є високотоксичними пірогенними макромолекулами та одними з найбільш потужних модуляторів імунної системи теплокровних тварин та людини [34-6]. Водночас бактеріальні ендотоксини вважаються найнебезпечнішими домішками, що є частою причиною пірогенності готових ін'єкційних лікарських засобів, активних фармацевтичних субстанцій (АФС) та виробів медичного призначення [4, 16, 17, 27].

Молекула ендотоксину, яка складається з ліпідної, полісахаридної та білкової частин,

після очищення втрачає білковий компонент і традиційно називається ліпополісахаридом (ЛПС) [2, 37].

ЛПС як компоненти зовнішньої мембрани клітинної стінки грамнегативних бактерій постійно вивільняються в навколишнє середовище під час зростання, ділення, загибелі або лізису мікробної клітини [17, 38]. Клітинна стінка грамнегативних бактерій складається з зовнішньої оболонки, внутрішньої цитоплазматичної мембрани та тонкого шару пептидогліканів [35]. Двошарова зовнішня мембрана має складну будову: у зовнішньому шарі присутні, головним чином, ліпополісахариди та мінорна кількість білків, до складу ж внутрішнього шару входять білки та фосфоліпіди [35, 39, 40].

Структура. Ліпополісахаридний комплекс має такий елементарний склад: С — 49 %, Н — 7.5 %, N — 1.5 %, Р — 3 %, зола — 7–10 %, і містить гідрофільні та гідрофобні групи, що надає молекулі амфифільних властивостей [38, 41]. Гідрофобною частиною ЛПС занурюється в ліпідний шар зовнішньої мембрани, а гідрофільна частина виступає в позаклітинне середовище [42, 43].

Структура ЛПС складається з ліпідного компонента (ліпід А) та ковалентно приєднаного до нього гетерополісахариду, в якому вирізняють варіабельну частину — О-специфічний полісахарид та консервативну — олігосахарид кору (Рис. 1) [16, 27, 41].

О-специфічний полісахарид (ОПС) являє собою ланцюг з 20–40 мономерних одиниць лінійної або розгалуженої структури, кожна з яких включає від 1 до 10 різних моносахаридних залишків. Повторювані ланки полісахариду характеризуються значною різноманітністю і визначають серологічну специфічність різних грамнегативних бактерій. Так, наприклад, існує понад 200 О-ланцюгових варіантів (серотипів) у сальмонел і 100 — у *Escherichia coli* [44, 45]. Широка варіабельність складу і просторової структури ОПС у межах одного виду дозволяє патогенним організмам одних штамів «унікати» набутого імунітету до інших штамів [1, 35, 46].

Олігосахарид кору (кір) має більш консервативну структуру, ніж О-ланцюг, і містить зовнішню та внутрішню частини. До складу зовнішнього кору входять гексози і аміноукри, головним чином, 2-аміно-2-дезоксиглюкоза і/або 2-аміно-2-дезоксигалактоза. Внутрішній кір включає залишки L-гліцеро-О-маногептози й унікальну октозу — 2-кето-3-дезоксіоктонову кислоту, яка в природі практично ніде більше не зустрічається і відіграє своєрідну роль містка між кором і ліпідом А [35, 40]. Слід відзначи-

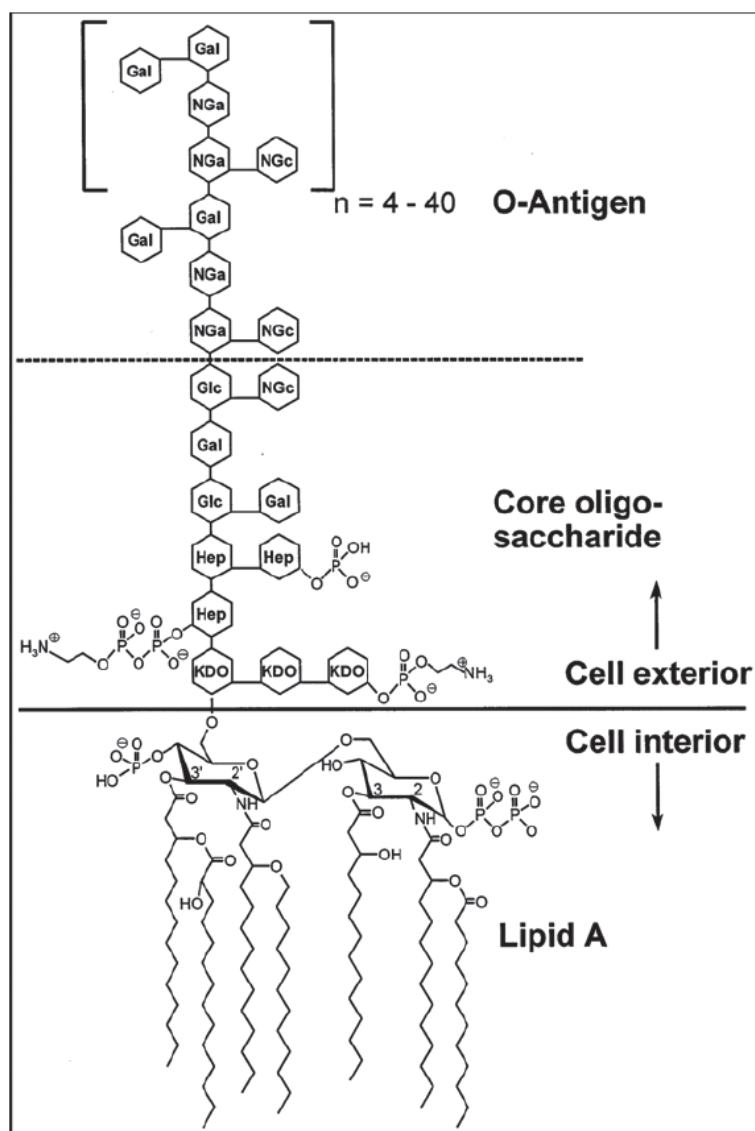
ти, що ділянка центрального олігосахариду та ліпід А частково фосфорильовані, тому в розчинах з нейтральним та основним рН молекула ендотоксину має негативний заряд [36].

Ліпід А є найконсервативнішою частиною молекули ЛПС, яка залишалась майже незмінною упродовж еволюції мікроорганізмів, і є унітарним для більшості родин грамнегативних бактерій [34]. Ліпід А містить основу з двох молекул глюкозаміну, з'єднаних β -1,6-глікозидним зв'язком. У глюкозаміні гідроксильні групи при 1'-атомі та 4'-атомі вуглецю фосфорильовані, а інші гідроксильні групи та аміногрупи етерифіковані гідроксиміристиновою жирною кислотою (4–8 жирнокислотних залишків) [34, 35].

Ліпід А — токсична частина макромолекули ЛПС, відповідальна за пірогенну та імунобіологічну активність [11, 39, 40, 47]. Встановлено, що саме особливості будови гідрофільної частини ліпід А є важливими для проявлення токсичного ефекту бактеріальних ендотоксинів і залежать від кількості ацильних замісників, їх розміщення, довжини і ступеня фосфорильовання [48].

Показано, що для прояву пірогенності не обов'язкова присутність двох сахаридних залишків у гідрофільній частині ліпід А. Пірогенність, хоч і слабшу, демонструють деякі моносахаридні аналоги ліпід А та дисахарид-

Рисунок 1

Хімічна структура ендотоксину *Escherichia coli* O111:B4 [16]

Позначення:

[Hep] — L-гліцерино-D-маногептоза, [Gal] — галактоза, [Glc] — глюкоза,

[KDO] — 2-кето-3-дезоксіоктонова кислота, [NGa] — N-ацетил-галактозамін, [NGc] — N-ацетил-глюкозамін

ні аналоги, які не містять ацилоксиацильного залишку [48].

Пірогенна активність ліпіда А значно підвищується у разі його з'єднання з інертними носіями — казеїном, альбуміном та γ -глобуліном сироватки [38].

Роль фосфатів, імовірно, полягає лише у створенні негативних зарядів, оскільки хімічна заміна їх на фосфорно-оксидні групи не позначалася на біологічній активності [38].

Фізико-хімічні властивості. Молекулярна маса мономера ендотоксину зазвичай становить від 10 до 20 кДа внаслідок мінливості олігосахаридного ланцюга, але, як виняток, у ендотоксинів з коротким О-ланцюгом може не перевищувати 2.5 кДа або, навпаки, досягати 70 кДа у ендотоксинів, що мають дуже довгі О-олігополісахариди [35].

Просторова структура молекули ЛПС залежить від різних факторів, зокрема від довжини вуглеводних ланцюгів, між якими, можливо, виникають іонні зв'язки [49].

У водних розчинах внаслідок неполярних взаємодій між ліпідними ланцюгами молекул ЛПС та завдяки двовалентним катіонам, які з'єднують фосфатні групи мономерних структур, бактеріальні ендотоксини утворюють надмолекулярні агрегати [35, 36]. Дані електронної мікроскопії, рентгенодифракційного аналізу, ІЧ-Фур'є спектроскопії та ЯМР свідчать, що ендотоксини можуть міститись у різноманітних формах: у вигляді ламел або утворювати пластинчасті, кубічні або гексагональні інвертовані композиції діаметром до 0.1 мкм та 1000 кДа, стійкість яких залежить від фізико-хімічних характеристик водного розчину (рН, іони, поверхнево-активні речовини тощо) [36, 50, 51]. Виявлено, що в присутності іонів Ca^{2+} или Mg^{2+} ЛПС утворює достатньо великі агрегати діаметром більше 0.1 мкм та молекулярною масою вище 1000 кДа [33]. Такі надмолекулярні структури, хоча й проходять через фільтр з розміром пор 0.22 мкм, водночас ефективно затримуються на фільтрі з розміром пор 0.025 мкм [33]. Встановлено, що протеїни здатні зміщувати рівновагу агрегатного стану, вивільняючи мономери ЛПС з агрегатів [35, 36, 52]. Відповідно до молекулярної динаміки, тривимірна структура ендотоксину набагато гнучкіша, ніж глобулярна структура білків [35, 53].

Природні молекули ендотоксинів можуть існувати одночасно в декількох складних формах, утворювати комплекси з протеїнами, зазнавати часткової деградації, що позначатиметься на їх пірогенній активності [39, 40].

Патофізіологічні ефекти. Екзогенні бактеріальні ендотоксини взаємодіють з імунокомпетентними клітинами макроорганізму, що призводить до активації систем клітинного і гуморального імунітету, секреції макрофагами медіаторів запалення — альфа-фактора некрозу пухлин (TNF- α), інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), фактора активації тромбоцитів, хемокінів і ейкозаноїдів, вільних радикалів, бактерицидних агентів — лізоциму, кислих гідролаз, лактоферину [17, 30, 31, 54].

Реакція ЛПС з клітинами макроорганізму викликає не тільки підвищення температури тіла, але й пригнічує імунну систему, дестабілізує метаболізм ліпідів та вуглеводів, що призводить до гіперглікемії з наступною гіпоглікемією, ініціює коагулопатію з розвитком гіпокальціємії, гіперкаліємії, гіперфосфатемії та метаболічного ацидозу, стимулює м'язову ригідність, артеріальну гіпер- і/або гіпотензію. Ендотоксемія супроводжується токсичним впливом практично на всі системи організму: фіксується крововилив у шлунково-кишковий тракт, некроз печінки, міокарда, кісткового мозку, нирок, лімфоїдної тканини, кори надниркових залоз та селезінки [55, 56]. Масивна транслокація ендотоксинів із кишечника може привести до септичного шоку [55, 56].

Перші наукові дослідження пірогенної реактивності бактеріальних ендотоксинів виявили мінімальну пірогенну дозу, у разі внутрішньосудинного введення якої спостерігається підвищення температури тіла людини (здорові добровольці) та тварини (кролики), а саме: 1 нг/кг очищених *Escherichia coli* і *Salmonella typhosa*, 50–70 нг/кг *Pseudomonas* [57]. Зазначено [58], що доза 1 нг/кг, яка достатня для ініціації пірогенної реакції, містить 25 000 бактеріальних клітин *E. coli*.

Незважаючи на співпадаючі значення мінімальної пірогенної дози, швидкість розвитку лихоманки та максимум температура тіла у разі ін'єкційного введення грамнегативних бактерій (*S. typhosa*, 0.005 мкг/кг) у здорових добровольців значно вище порівнюючи з кроликами [59].

Встановлено, що преінкубація ЛПС з плазмою крові ослаблює їх пірогенні властивості, що пояснюють зв'язуванням ендотоксину з ліпопротеїнами крові, переважно ліпопротеїнами високої щільності [30, 60].

У дослідах *in vivo* на щурах введення ЛПС (5–50 мкг/кг, внутрішньоочередово) через 30–180 хв дозозалежно підвищує температуру тіла тварин на (0.7–1.8) °C [61].

Дослідження *in vivo* підтвердили ключову роль ліпіда А в реалізації пірогенної активності бактеріальних ендотоксинів [53, 62]. Так, після фракціонування ЛПС (гідроліз, розчин оцтової кислоти 1%) фракція ліпіда А, на відміну від полісахаридної фракції, проявляє виражену токсичність в експерименті на мишах [62]. У разі внутрішньовенного введення мишам препаратів ЛПС *Salmonella Typhimurium* (група А), ліпіда А (група В) та О-полісахариду (група С) геморагічний некроз виявляється тільки в перших двох групах (А та В) [53].

Встановлені параметри гострої токсичності ЛПС *E. coli*, штами М-17 та О55:В5, у разі їх внутрішньоочеревинного введення мишам за LD_{50} (середньосмертельна доза) — 40 мкг/миша та 2000 мкг/миша відповідно [63].

Введення ендотоксину *E. coli*, штаму О113 (2 нг/кг, внутрішньовенно), здоровим добровольцям індукувало швидке зростання температури тіла з максимумом до 38.5 °С через 4 год на фоні тахікардії, помірної гіпотензії і транзиторної лімфопенії. Гостра запальна реакція супроводжувалась ендотоксин-стимульованим підвищенням у плазмі індикаторів системного запалення (TNF- α , IL-6), вміст яких досягнув максимуму через 2 год і повернувся до вихідного рівня через 4–6 год. Штаму ендотоксину *Escherichia coli* О113, введений мишам (лінія С57BL/6) внутрішньоочеревинно в дозі 500 нг/кг, не виявляв пірогенної активності і прозапальних властивостей [64].

Після внутрішньовенного введення здоровим добровольцям 2–4 нг/кг очищеного ЛПС *E. coli* вже через 5 хв спостерігається пік концентрації (C_{max}) бактеріальних ендотоксинів у крові; через 60–90 хв — підвищення температури тіла, яке корелює з максимумом рівня маркерів запалення в крові (TNF- α , IL-6) та вираженою клінічною симптоматикою лихоманки. У 100 % учасників дослідження реєструється тахікардія, міальгія, головний біль, у 75 % — озноб; дещо пізніше, через 120 хв, розвивається гіпотензія. Згідно з даними лабораторних досліджень, протягом першої години після експозиції ендотоксину реєструється зниження лейкоцитів у крові, потім — різке їх зростання на фоні нейтрофілії [65].

Встановлено [66-70], що ЛПС має велике значення для процесу інфікування та розвитку патологічних змін макроорганізму. ЛПС *Vibrio cholerae* виступає основним фактором високої інфекційності та патогенності збудника холери [68]; ЛПС *Chlamidia trachomatis* призводить до загибелі сперматозоїдів людини [70]; ЛПС *Fusobacterium nucleatum* пригнічує клітинний

ріст та синтез ДНК у зрілих та зародкових фіброblastів ясен людини, що може бути суттєвим для розвитку запалення ясен [69]. На чутливих і нечутливих до зараження ЛПС мишах встановлено важливу роль ЛПС *E. coli* в патогенезі гемолітичного уремичного синдрому [66]. ЛПС *Helicobacter pylori* викликає симптоми гастриту у разі інфікування ендотоксином ЛПС-чутливих мишей (лінія С3Н/He) [67].

Виявлена здатність ЛПС до активації в кардіоміоцитах, макрофагах і гепатоцитах індукційної NO-синтази (iNOS) [71]. Автори припускають, що саме ЛПС-стимульоване утворення NO через розлад регіонального кровотоку, формування дифузійного бар'єра для кисню та пригнічення мітохондріального дихання призводить у разі септичного шоку до дисфункції міокарда [72].

На тлі так званої «ендотоксिनної агресії» можуть розвиватися критичні термінальні стани та тяжкі ускладнення з несприятливим клінічним прогнозом (синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання, ендотоксинний шок, гостра поліорганна недостатність) [1]. В експерименті *in vitro* підтверджено, що у разі високої концентрації ліполісахариду та низької активності комплементу можуть утворюватися мембрано-атакуючі комплекси, які не зв'язані з мембранами бактерій та здатні викликати лізис будь-яких клітин організму. Ці комплекси обумовлюють вкрай високу токсичність ендотоксину *in vivo* й, імовірно, викликають масове ураження клітин ендотелію судин, що призводить до виникнення синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові [39].

Пірогени неендотоксिनної природи. Пірогенні речовини природного або синтетичного походження, що не є ендотоксинами грамнегативних бактерій, хоча й значно рідше, також можуть потрапити в ін'єкційні препарати як проміжні продукти технологічного процесу або внаслідок недосконалості або якихось порушень останнього [1, 44, 50, 73-75, 76-79].

Пірогенну активність виявляють грампозитивні бактерії та компоненти їх клітинної оболонки (пептидоглікани), а також ентеротоксини *Staphylococcus aureus* і екзотоксини *Streptococcus pyogenes*, що вивільняються в навколишнє середовище в процесі життєдіяльності мікроорганізмів [1, 44, 79].

Мікобактерії (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*) виділяють з зовнішньої мембрани пірогенний ліпоарабіноманан — слабо розгалужений полімер арабінози, манози та залишків жирних кислот, який завдяки активації патерн-розпізнавальних рецепторів

(TLR6) хазяїна виявляє опосередковану токсичну дію на організм людини [76].

Найбільш патогенні представники класу *Spirochaetes* (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*) містять ліпопротеїни і ліпопептиди, які є тригером рецидивуючої лихоманки. *In vitro* показано, що ліпопротеїни/ліпопептиди використовують CD14-залежний шлях сигнальної трансдукції, який відрізняється від добре відомих шляхів розпізнавання хазяїном молекули ЛПС [78].

Важливими неендотоксिनними пірогенами природного походження є також віруси та їх компоненти, мікоплазми, гриби, включаючи дріжджові гриби, та компоненти клітинної оболонки грибів — β -глюкани, полісахариди та білкові комплекси криптококів, водорості і найпростіші [1, 77, 79].

Пептидоглікан і ліпотейхоева кислота — основні складові клітинної стінки грампозитивних бактерій, які в організмі людини стимулюють продукцію цитокінів і метаболізм арахідонової кислоти в моноцитах [80]. Ліпотейхоева кислота *Streptococcus faecalis* виступає в ролі активатора процесів коагуляції лізату амебоцитів *Limulus* та ініціює утворення гелю, але її активність в 1500 разів нижче активності ЛПС [81].

До пірогенних речовин природного немікробного походження відносять деякі антигени, чужорідні білки (сироватковий альбумін людини, бичачий гамаглобулін), полінуклеотиди, стероїдні гормони і їх метаболіти, жовчні кислоти (літохоліева кислота), речовини, які мають гіперсенситивно-алергенні властивості [73-75].

Активність піретика відома для деяких синтетичних сполук, наприклад суспензії фосфату кальцію, нуклеїнату натрію, синтетичних ад'ювантів та інших хімічних речовин. Показано, що внутрішньовенне введення кроликам фторопласту-4 також викликає різке підвищення температури тіла тварини [50].

Пірогенна активність ендотоксинів грамнегативних бактерій набагато вища за активність більшості пірогенних речовин небактеріально походження, за винятком β -глюканів [79]. Так, *in vivo* внутрішньосудинне введення кролям грампозитивних бактерій або грибів в дозі $10^7 - 10^8$ КУО/кг практично співпадає з пірогенним ефектом значно меншої дози *Escherichia coli*, яка дорівнює лише 10^4 КУО/кг [82]. Мінімальна пірогенна доза ендотоксину *E. coli* у випробуванні на кролях становила 0.05 нг/кг, водночас для ентеротоксину *Staphylococcus aureus* в 2000 разів вище — 1 мкг/кг [79].

Більш того, опубліковані нові дані стосовно високої забрудненості бактеріальними ендотоксинами тих компонентів мікроорганізмів, які раніше вважалися потенційними пірогенами. Так, ліпотейхоева кислота, після спеціальних заходів додаткового очищення, що сприяють видаленню ЛПС, втрачає здатність стимулювати імункомпетентні клітини макроорганізму [82].

Наведені дані дозволяють зробити висновок, що для парентеральних лікарських засобів, вироблених на фармацевтичному підприємстві за умов GMP, ймовірність пірогенної реакції, яка спричинена не ендотоксиною контамінацією, дуже низька або майже виключена [79].

ЛІТЕРАТУРА

1. Yokota S., Fujii N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa* // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. — 2007. — V. 30. — P. 97-109.
2. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багірова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. — М.: Типография ЦНИИ, 1997. — 96 с.
3. Крылов Ю.Ф., Кивман Г.Я. Биологический контроль безопасности лекарственных средств. — М.: Медицина, 1985. — 143 с.
4. Литвицкий П.Ф. Нарушения теплового баланса организма. Лихорадка // Вопросы современной педиатрии. — 2009. — Т. 8, № 6. — С. 55-63.
5. Литвицкий П.Ф. Нарушения теплового баланса организма: гипертермия, гипертермические реакции, тепловой удар, солнечный удар // Вопросы современной педиатрии. — 2010. — Т. 9, № 1. — С. 96-102.
6. Делягин В.М. Лихорадка. Многообразие причин и сложность решения // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. — 2011. — № 4. — С. 49-51.
7. Зайко М.Н., Биць Ю.В., Бутенко Г.М. та ін. Патолофізіологія: підручник / За ред. М.Н. Зайка і Ю.В. Биць. — [3-є вид.]. — К.: Медицина, 2010. — 704 с.
8. Копчук Т.Г., Роговий Ю.Є. Патолофізіологічний аналіз розвитку гарячки при уведенні пірогеналу в дозах 10, 25, 50 мкг/кг // Буковинський медичний вісник. — 2010. — Т. 14, № 1 (53). — С. 121-123.
9. Копчук Т.Г., Роговий Ю.Є. Патолофізіологічна роль гарячки // Світ медицини та біології. — 2012. — Т. 8, № 3. — С. 134-139.
10. Billroth T. Beobachtung-Studien uber Wundfieber und accidentelle Wundkrankheiten // Arch. Klin. Chir. — 1865. — V. 6. — P. 372-399.
11. Frese I.B. Experimentelle Beitrage zur Aetiologie des Fiebers, 1866. Diss. Dorpat.
12. Bennett I.J., Beeson P.B. The properties and biologic effects of bacterial pyrogens // Medicine. — 1950. — V. 29. — P. 365-400.
13. Atkins E., Bodel P. Clinical fever: its history, manifestations and pathogenesis // Fed. Proc. — 1979. — V. 38, No 1. — P. 57-63.
14. Wood W.B. Jr. [Pathogenesis of fever] // Triangulo. Rev. Sandoz. Cienc. Med. — 1962. — V. 5. — P. 101-106.
15. Snell E.S. Gram-negative bacterial endotoxin and the pathogenesis of fever // Prog. Drug. Res. — 1975. — V. 19. — P. 402-411.
16. Ohno N., Morrison D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity // J. Biol. Chem. — 1989. — V. 264. — P. 4434-4441.

17. Williams K.L. Endotoxins. Pyrogens LAL testing and Depyrogenation / Ed. By K.L. Williams. «Informa. Healthcare», 2007. — 417 p.
18. Wolstenholme G.E.W., Birch J. Pyrogenes and Fever, Edinburgh — London: «Churchill Livingstone», 1971.
19. Morrison S.F., Nakamura K., Madden C.J. Central control of thermogenesis in mammals // *Exp. Physiol.* — 2008. — V. 93. — P. 773-797.
20. Dalal S., Zhukovsky D.S. Pathophysiology and Management of Fever // *Support. Oncol.* — 2006. — V. 4. — P. 9-16.
21. Lazarus M., Yoshida K., Coppari R. et al. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses // *Nat. Neurosci.* — 2007. — V. 10. — P. 1131-1133.
22. Blatteis C.M. The onset of fever: new insights into its mechanism // *Prog. Brain Res.* — 2007. — V. 162. — P. 3-14.
23. Nakamura Y., Nakamura K., Morrison S.F. Different populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions // *Neuroscience.* — 2009. — V. 161, No 2. — P. 614-620.
24. Blatteis C.M. Age-dependent changes in temperature regulation — a mini review // *Gerontology.* — 2012. — V. 58, No 4. — P. 289-295.
25. Bartfai T., Conti B. Fever // *Scient. World J.* — 2010. — V. 10. — P. 490-503.
26. Черткова Ф.А., Шаповалова Т.Б. Бактериальные пирогены. — М., 1966. — 174 с.
27. Yokota S., Fujii N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa* // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* — 2007. — V. 30. — P. 97-109.
28. Burdon-Sandersen J. On the process of fever // *Practitioner.* — 1876. — V. 16. — P. 257-280, 337-358, 417-431.
29. Seibert F.B. Fever producing substance found in some distilled waters // *Am. J. Physiol.* — 1923. — V. 67. — P. 90.
30. Amersfoort E.S., Van Berkel T., Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — V. 16. — P. 379-414.
31. Hasunuma R., Morita H., Tanaka S. et al. Differential clearance and induction of host responses by various administered or released lipopolysaccharides // *J. Endotoxin Res.* — 2001. — V. 7. — P. 421-429.
32. Cooper K.E., Cranston W.I., Honour A.J. Observations on the site and mode of action of pyrogenesis in the rabbit brain // *J. Physiol. (London).* — 1967. — No 325. — P. 191.
33. Ульмер Г., Брюк К., Вальдек Ф. и соавт. Физиология человека: В 4 т. — Т. 4.; пер. с англ. / под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. — М.: Мир, 1986. — 312 с.
34. Журавко А.С., Швец В.И. Свойства бактериальных эндотоксинов и методы их удаления из биофармацевтических препаратов // *Вестник МИТХТ. Химия и технология лекарственных препаратов и биологически активных соединений.* — 2014. — Т. 9, № 4. — С. 27-33.
35. Magalhaes P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G. et al. Methods of endotoxin removal from biological preparation: A review // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* — 2007. — V. 10. — P. 388-404.
36. Petsch D., Anspach F.V. Endotoxin removal from protein solutions // *J. Biotechnol.* — 2005. — V. 76. — P. 97-119.
37. Сорокин А.В. Пирогены. — Л.: Медицина, Ленинградское отделение, 1965, 176 с.
38. Erridge C., Poxton V.J. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microbes. Infect.* — 2002. — V. 4. — P. 837-851.
39. Еськов А.П., Каюмов Р.И., Соколов А.Е. Механизм токсического действия эндотоксина *in vivo* // *Токсикол. вестн.* — 2003. — № 3. — С.15-18.
40. Здорovenko Е.А., Позур В.К., Кучеренко М.С. Біологічна активність ліпополісахаридів грамнегативних бактерій // *Біополіим. клет.* — 2000. — № 2. — С. 5-15.
41. Kaetz Ch.R.H. Biochemistry of endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* — 1990. — V. 59. — P. 129-170.
42. Nikaido H., Nakase T. The outer membrane of gram-negative bacteria // *Advances in Microbial Physiology / Eds. A.H. Rose, J.G. Moriss.* — London: Acad. Press. — 1979. — V. 20. — P. 163-250.
43. Rietschel E.Th., Brade H. Bacterial endotoxins // *Sci. Amer.* — 1992. — V. 267. — P. 54-61.
44. Raetz C., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — V. 71. — P. 635-700.
45. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides // *Carbohydr. Res.* — 2003. — V. 338. — P. 2431-2447.
46. Preston A., Mandrell R.E., Gibson B.W. et al. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria // *Crit. Rev. Microb.* — 1996. — V. 22. — P. 139-180.
47. Zhang Y., Gaekwad J., Wolfert M.A. et al. Modulation of innate immune responses with synthetic lipid A derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129. — P. 5200-5216.
48. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Липополисахариды грамотрицательных бактерий. 1. Общая характеристика ЛПС и липина А // *Биохимия.* — 1993. — Т. 58, № 2. — С. 166-181.
49. Erridge C., Poxton V.J. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microbes. Infect.* — 2002. — V. 4. — P. 837-851.
50. Патологическая физиология / Под ред. А.Д. Адо, В.И. Пыцкого, Г.В. Порядина, Ю.А. Владимировой. — М.: Триада-Х, 2000. — 574 с.
51. Parikh S.J., Chorover J. Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution // *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* — 2007. — V. 55. — P. 241-250.
52. Hirayama C., Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles // *J. Chrom. B.* — 2002. — V. 781. — P. 419-432.
53. Jshikawa Y., Kirikae T.F., Hirata M. et al. Local skin response in mice induced by a single intradermal injection of bacterial lipopolysaccharide and lipid A // *Infect. Immunol.* — 1991. — V. 59, No 6. — P. 1954-1960.
54. Kirikae T., Nitta T., Kirikae F. et al. Lipopolysaccharides (LPS) of oral blackpigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of *Salmonella* LPS // *Infect. Immun.* — 1999. — V. 67. — P. 1736-1742.
55. Matot I., Sprung C.C. Definition of sepsis // *Intensive. Care. Med.* — 2001. — V. 27, No 1. — P. S3-S9.
56. Opal S.M. Endotoxins and other sepsis triggers // *Contrib. Nephrol.* — 2010. — V. 167. — P. 14-24.
57. Greisman S.E., Hornick R.B. Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1969. — V. 131, No 4. — P. 1154-1158.
58. Pearson F.C. Relative potency of «environmental» endotoxin as measured by the *Limulus* amebocyte lysate test and the USP rabbit pyrogen test // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1982. — V. 93. — P. 65-77.
59. Wolff S.M. Biological effects of bacterial endotoxins in man // *J. Inf. Dis.* — 1973. — V. 128. — P. S259-S264.
60. Ulevitch R., Johnston A. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum // *J. Clin. Invest.* — 1978. — V. 62. — P. 1313-1324.
61. Висмонт А.Ф., Висмонт Ф.И. Антипиретический эффект L-валина у крыс и кроликов в условиях эндотоксической лихорадки // *Докл. Нац. академии наук Беларуси.* — 2011. — Т. 55, № 4. — С. 76-78.
62. Kato N.F., Kido N., Ohta M. et al. Comparative studies on adjuvanticity of *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide and its lipid

- A and polysaccharide fractions // Immunology. — 1985. — V. 54. — P. 317-324.
63. Варбанец Л.Д., Здоровенко Э.А., Гаркавая Е.Г. и соавт. Липополисахарид *Escherichia Coli* M-17 // Микробиология. — 2012. — Т. 81, № 3. — С. 353.
64. Copeland S.L., Warren S., Lowry S.F. et al. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans // Clin. Diagnos. Lab. Immune. — 2005. — V. 12, No 1. — P. 60-67.
65. Martich G.D., Boujoukos A.J., Suffredini A.F. Response of man to endotoxin // Immunobiol. — 1993. — V. 187, No 3-5. — P. 403-416.
66. Karpman D., Connell H., Schuetz F. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* 0157. H7 infection // J. Infect. Diseases. — 1997. — V. 175. — P. 611-620.
67. Moran A.P., Appelmelk B.J., Aspinal G.O. Molecular mimicry of host structures by lipopolysaccharides of *Campylobacter* and *Helicobacter spp.*: implications in pathogenesis // J. Endotoxin Res. — 1996. — V. 3, No 6. — P. 521-531.
68. Shimizu T., Yanagihara Y., Isshiki Y. et al. Biological activities of lipopolysaccharide isolated from *Vibrio cholerae* 0139, a new epidemic strain for nicent cholera in Indian subcontinent // Microbiol. Immunol. — 1994. — V. 38, No 6. — P. 471-474.
69. Onoue S., Niwa M., Isshiki Y. et al. Extraction and characterization of the smooth-type lipopolysaccharide from *Fusobacterium nucleatum* JCM 8532 and its biological activities // Microbiol. Immunol. — 1996. — V. 40, No 5. — P. 323-331.
70. Caloliero F., Sommese L., Gorga F. et al. Toxic effect on human spermatozoa by *Chlamidia trachomatis* purified lipopolysaccharide // FEMS Microbiol. Lett. — 1997. — V. 115. — P. 197-220.
71. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharmacol. Rev. — 1990. — V. 43. — P. 109-142.
72. Thiemeermann C. The role of the L-arginine nitric oxide pathway in circulatori shock // Adv. Pharmacol. — 1994. — V. 28. — P. 45-79.
73. Sladowski D., Kinsner A., Langezaal I. et al. Activation of the complement system as an indicator of pyrogenic reaction to lipopolysaccharide (LPS) // Toxicol. In Vitro. — 2001. — V. 15, No 4-5. — P. 339-342.
74. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides // Microbes. & Infection. — 2005. — V. 4. — P. 837-851.
75. Варбанец Л.Д. Эндотоксины грамотрицательных бактерий: структура и биологическая роль // Микробиол. журн. — 1994. — 56, № 3. — С. 76-98.
76. Silver R.F., Li Q., Ellner J.J. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions // Infect. Immun. — 1998. — V. 66, No 3. — P. 1190-1199.
77. Rondanelli M., Opizzi A., Monteferrario F. The biological activity of beta-glucans // Minerva. Med. — 2009. — V. 100, No 3. — P. 237-245.
78. Remand D.A. The search for unrecognized pathogens // Science. — 1999. — V. 21, No 284 (5418). — P. 1308-1310.
79. Novitsky T.J. BET vs. PT. Non-endotoxin Pyrogens // LAL Update. — 2002. — V. 20. — No 2. — P. 1-5.
80. Auer G.K., Weibel D.B. Bacterial Cell Mechanics // Biochemistry. — 2017. — V. 25, No 56 (29). — P. 3710-3724.
81. Renzi P.M., Lee C.H. A comparative study of biological activities of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide // J. Endotoxin. Res. — 1995. — V. 2, P. 431-441.
82. Gao J.J., Xue Q., Zuvanich E.G. et al. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro // Infect. Immun. — 2001. — V. 69, No 2. — P. 751-757.

УДК 615.456.07

Меркулова Ю. В.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Пирогенная реакция и пирогены как составляющая проблемы безопасности парентеральных препаратов

Статья содержит обзор литературы относительно проблемы пирогенной загрязненности парентеральных лекарственных средств, механизма реализации токсического действия пирогенов и клинической симптоматики «эндотоксической агрессии» у человека. Основная причина пирогенности лекарственных средств — эндотоксины (липолисахариды) грамотрицательных бактерий, которые не удаляются стандартными методами стерилизации и вызывают в организме ряд тяжелых патологических процессов вплоть до летальности. Приведены современные данные относительно химического состава, пространственной трехмерной структуры, физико-химических свойств и патофизиологических эффектов липополисахаридов. Проанализирована группа неэндотоксических пирогенов (липoteichoic acid, фунгальные β -глюканы, пептидоглюканы, вирусы, водоросли, синтетические адьюванты и другие), которые в настоящее время привлекают внимание, главным образом, как потенциальные пирогенные примеси фармацевтических препаратов.

Ключевые слова: пирогенная реакция, пирогены, бактериальные эндотоксины.

UDC 615.456.07

Merkulova Yu.V.

State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»

Pyrogen reaction and pyrogens in relation to the safety of parenteral preparations

This paper reviews milestones of lipopolysaccharide (LPS) from the first investigation on the process of fever, in 1865; to the validation of lipopolysaccharide structure, function and activity in present day.

These fever-inducing substances (LPS endotoxins) are not eliminated by standard sterilisation processes, and are biologically active once in the bloodstream, causing risks to human health, ranging from febrile to septic shock and death. Therefore, for injectable formulations, avoiding the presence of pyrogens is crucial.

This review focuses on the mechanisms, particularly pyrogenic substances, involved in thermoregulation in humans and homoiothermal animals, in conditions of fever. In the presence of LPS monocytes/macrophages release endogenous pyrogens (cytokines) such as interleukin-1 and interleukin-6, tumor necrosis factor, which act directly on the hypothalamus to effect a fever response by promoting an increase in heat generation and a decrease in heat loss.

Many other compounds, originating from fungi, yeast, viruses, and parasites also have been shown to induce a human immune reaction and to cause problems when overcoming the natural protective barriers of the human body. Only recently, the relevance of nonendotoxin pyrogens, e.g., lipoteichoic acid, fungal β -glucans, peptidoglycan or Toll-like receptor-agonists, has gained more attention, mainly as a cause of human pyrogen reactions.

Keywords: pyrogen reaction, pyrogens, bacterial endotoxin.

Меркулова Юлія Вадимівна. К. б. н. (2002), провідний науковий співробітник Лабораторії фармакопейного аналізу ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». ID. orcid.org /0000-0002-0421-9611.

До відома авторів журналу «Фармаком»

ВИМОГИ ДО ПУБЛІКАЦІЙ

ЗАГАЛЬНІ ВИМОГИ

1. Редакція журналу приймає до розгляду аналітичні статті з актуальних питань розвитку науки та інноваційної діяльності у фармацевтичній галузі як в Україні, так і у світі.
2. У журналі також друкуються інформаційні повідомлення про ювілейні дати, пам'ятні та видатні події у сфері фармації.
3. Статті піддаються науковому рецензуванню, за результатами якого ухвалюється рішення про доцільність публікації роботи. Також за результатами наукового рецензування статті можуть бути повернені авторам на доопрацювання. Відправлені авторам на доопрацювання і виправлення статті слід повернути до редакції не пізніше ніж за 7 днів після отримання.
4. Відхилені статті не повертаються і повторно не розглядаються.
5. Редакція залишає за собою право редакційної правки статей, яка не спотворює їхнього змісту.
6. Матеріали статей та коректура авторам не повертаються.
7. Публікація матеріалів у науково-практичному журналі «Фармаком» платна. Вартість розміщення статті — 46 грн / 1 стор. у Word. Якщо публікація термінова, оплата здійснюється за подвійним тарифом.
8. Оплата здійснюється після рецензування статей і їх схвалення до друку, про що авторів повідомляють додатково.
9. Робота подається українською, російською або англійською мовою, в 2 примірниках, підписаних усіма авторами, а також в електронному варіанті електронною поштою або на електронному носії.
10. До статті має додаватися заява автора (за наявності співавторів — спільна, за підписами усіх співавторів) про те, що стаття є власною розробкою автора (авторів), ніде раніше не друкувалася і не знаходиться на розгляді в інших виданнях), і експертний висновок про можливість публікації у відкритій пресі.
11. Відповідальність за достовірність інформації в публікаціях несуть автори.
12. Оригінали статей і рецензій зберігаються в редакції протягом 1 року після виходу відповідного номера.

СТРУКТУРА І ЗМІСТ СТАТТІ

1. УДК (на початку статті в лівому верхньому куті).
2. Назва статті мовою статті (рядковими літерами жирним шрифтом).
3. Прізвище І.Б., Прізвище І.Б. мовою статті.
4. Назва організації або установи, де працює(ють) автор(и), мовою статті.
5. Резюме мовою статті (80-150 слів). У резюме слід відобразити мету статті, постановку проблеми, основні висновки. При складанні резюме рекомендується дотримуватися вимог ДСТУ 7.9-95.
6. Ключові слова (5-7 слів).
7. Основний текст статті. Рекомендується структурувати роботу за допомогою підзаголовків. Стаття може містити такі елементи:

- *Вступ* (слово «Вступ» писати не обов'язково): містить постановку проблеми в загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, на яких засноване розв'язання даної проблеми і на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, котрим і присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановку задачі);
 - *Матеріали і методи досліджень*: викладають основний матеріал дослідження;
 - *Результати досліджень і їх обговорення*: наводять обґрунтування отриманих наукових результатів. У даному розділі слід уникати прямого повторення даних з таблиць. Обговорення результатів необхідно обмежити розглядом лише найважливіших встановлених фактів з урахуванням попередніх даних щодо досліджуваного питання. Інакше кажучи, більша частина обговорення має бути присвячена інтерпретації результатів.
 - *Висновки*: наводять висновки з даного дослідження і перспективи подальших розробок у даному напрямку.
8. Література: список використаних джерел інформації, оформлений згідно з ДСТУ ГОСТ 7.1:2006. Список літератури надається в порядку цитування джерел у статті. У тексті посилання на використані джерела нумеруються в порядку появи і позначаються в квадратних дужках [1, 2, 3-10].
 9. Переклад на англійську та російську мову заголовка статті, П.І.Б. авторів, назв організацій і ключових слів.
 10. Розширене резюме англійською мовою (150-300 слів).
 11. Відомості про авторів мовою статті, що містять:
 - П.І.Б. усіх авторів (повністю, без скорочень);
 - назву посади, наукове звання (із зазначенням року), науковий ступінь (із зазначенням року);
 - місце роботи;
 - робочу адресу, контактні телефон та e-mail для листування (дані не публікуються в журналі).

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТЕКСТУ

1. Формат сторінки — А4, книжкова.
2. Шрифт — Times New Roman.
3. Розмір шрифту — 14.
4. Інтервал — 2.0.
5. Вирівнювання — по ширині.
6. Поля документа — 2.5 мм.
7. Обсяг — не більше 15 сторінок (без урахування резюме).
8. Усі сторінки тексту мають бути пронумеровані.
9. Скорочення і умовні позначення, крім загальноновживаних у наукових і технічних текстах, застосовують у виняткових випадках або дають їх визначення при першому вживанні.
10. Усі вимірювання подаються в системі одиниць СІ.
11. Усі аббревіатури мають бути розшифровані при першому згадуванні.
12. У числах, які представляють собою десяткові дроби, цілі числа від дробової частини слід відокремлювати точкою.

13. Комп'ютерний набір статті має виконуватися в текстовому редакторі MS Word 97, під час написання в іншій версії — у форматі «rtf».
14. Формули мають бути набрані в редакторі формул, вбудованому в MS Word (Microsoft Equation).

Звертаємо увагу авторів, що при використанні ними формату «docx» деякі символи можуть бути втрачені при редакційній обробці.

ОФОРМЛЕННЯ МАЛЮНКІВ/ТАБЛИЦЬ

1. Ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті й мають бути підписані.
2. Малюнки/таблиці наводяться в тексті статті, без обтікання.
3. Посилання на таблиці і малюнки наводяться в тексті статті як (Табл. 1, Рис. 1).
4. Графіки, діаграми та ін. рекомендується будувати в табличному редакторі Excel 97. Якщо є ілюстративний матеріал, створений за допомогою інших програм, зображення необхідно подавати у векторному форматі WMF.
5. На графіку мають бути позначені експериментальні точки.
6. Фотографії, файли з растровими зображеннями мають бути високої якості, не повинні мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар тощо). Формати файлів— «tiff», «bmp».
7. Криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки.
8. Структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані в спеціалізованих програмах типу ChemWin і надані у векторному форматі «wmf».
9. Різні види ілюстративного матеріалу не мають дублювати один одного.

Зверніть увагу! Друкована версія журналу виходить у чорно-білому виконанні, авторам слід це враховувати при кольоровому оформленні графіків і малюнків.

При невиконанні зазначених вимог статті розглядатися не будуть.

Приклад заяви

Головному редактору журналу «Фармаком»
члену-кор. НАН України, д.фарм.н., професору
Георгієвському В.П.

ЗАЯВА

Цим засвідчую, що стаття, надана для публікації у науково-практичному журналі «Фармаком» (далі — «Фармаком») на тему «___», (___ стор.) є моєю власною розробкою, раніше не публікувалась і не друкувалась в інших наукових виданнях, не знаходиться на розгляді в інших журналах. Я ознайомився(лася) з вимогами до подання й оформлення наукових статей до журналу та даю згоду на публікацію статті у наступному номері «Фармакома».

«___» _____ 20__ р.

П.І.Б.