

## Зміст

<b>У ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»</b> .....	3
<i>Георгієвський В.П.</i>	
Роль Державної Фармакопеї України як основного нормативного документа, що регламентує якість лікарських засобів, у роботі фахівців фармацевтичної галузі .....	4
<i>Гризодуб О.І.</i>	
Проблеми забезпечення фармакопейної якості фармацевтичних субстанцій при виготовленні лікарських засобів в промисловості та в умовах аптек України .....	8
<i>Асмолова Н.М.</i>	
Питання якості інфузійних розчинів аптечного та промислового виробництва з точки зору Державної Фармакопеї України .....	13
<b><u>До видання Доповнення до Державної Фармакопеї України</u></b>	
5.4. Залишкові розчинники .....	20
2.4.24. Ідентифікація та контроль залишкових розчинників .....	33
<i>Гризодуб О.І.</i>	
Про проекти загальних статей ДФУ 2.4.24. Ідентифікація та контроль залишкових розчинників та 5.4. Залишкові розчинники .....	40
Продукти ферментації .....	45
Макроголи .....	47
<b><u>Проблеми. Пошук. Рішення.</u></b>	
<i>Сельнікова О.П., Думанський В.Д., Моїсєєва А.В., Гергієвський В.П., Піотровська А.Г., Крупа Н.О.</i>	
Імунобіологічні (біологічні) препарати в національних і міжнаціональних Фармакопеях .....	50
<i>Георгієвський В.П., Діхтярьов С.І., Маслова Н.Ф., Півень О.П., Стангара В.М.</i>	
Захист прав інтелектуальної власності в галузі створення лікарських засобів .....	67
<b><u>Синтез та вивчення фармакологічної дії</u></b>	
<i>Українець І.В., Абдель Насер Х.Н. Дакках, Безуглий П.О, Горохова О.В., Сигоренко Л.В.</i>	
Синтез і біологічні властивості 3',4'-дифторанілідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот .....	71
<b><u>Одержання лікарських і допоміжних речовин</u></b>	
<i>Зайцев О.І.</i>	
Вивчення технологічних факторів створення комплексної лікарської субстанції продовженої дії "Декацеол" на основі синтетичних алюмосилікатів .....	75
<b><u>Біотехнологічні дослідження</u></b>	
<i>Іванов В.В., Бизов В.В., Сандомірський Б.П., Гальченко С.Є.</i>	
Деякі біофармацевтичні властивості екстракту кріоконсервованих фрагментів ксеноселезінки .....	78
<b><u>Стандартизація лікарських засобів</u></b>	
<i>Котова Е.Е., Зінченко О.А., Куліков А.Ю., Котов А.Г., Хованська Н.П., Дячок В.В.</i>	
До питання про методи стандартизації риб'ячого жиру. Визначення жирнокислотного складу і кількісного вмісту вітаміну D <sub>3</sub> у риб'ячому жирі .....	83
<i>Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Ковальов В.М., Комісаренко А.М., Тимченко М.М.</i>	
Розробка методів стандартизації нового лікарського засобу піфламін .....	92
<b><u>Готові лікарські засоби</u></b>	
<i>Спиридонов В.М., Кобзар Г.І., Чусшов В.І., Спиридонов С.В., Бєліков В.В., Шермухамедова О.Г.</i>	
Сушення та деконтамінація гранул на основі активованих порошків насіння гіркокаштана звичайного та висівок пшеничних .....	97
<i>Блоконь І.Ф.</i>	
Вплив допоміжних речовин на протимікробну активність нітазолу .....	101
<b><u>Рослинні препарати та їх фармакологічна дія</u></b>	
<i>Абу Захер Кхалед, Журавльов М.С., Мартинов А.В.</i>	
Вивчення фотодинамічної протипухлинної активності суми катехінів і лейкоантоціанідинів видів роду щавель .....	105

## Содержание

<b>В ГП «Научно - экспертный фармакопейный центр»</b> .....	3
<i>Георгиевский В.П.</i> Роль Государственной Фармакопеи Украины как основного нормативного документа, регламентирующего качество лекарственных средств, в работе специалистов фармацевтической отрасли .....	4
<i>Гризодуб А.И.</i> Проблемы обеспечения фармакопейного качества фармацевтических субстанций при изготовлении лекарственных средств в промышленности и в условиях аптек Украины .....	8
<i>Асмолова Н.Н.</i> Вопросы качества инфузионных растворов аптечного и промышленного производства с точки зрения Государственной Фармакопеи Украины .....	13
<b>К изданию Дополнения к Государственной Фармакопее Украины</b>	
5.4. Остаточные растворители .....	20
2.4.24. Идентификация и контроль остаточных растворителей .....	33
<i>Гризодуб А.И.</i> О проектах общих статей ГФУ 2.4.24. Идентификация и контроль остаточных растворителей и 5.4. Остаточные растворители .....	40
Продукты ферментации .....	45
Макроголы .....	47
<b>Проблемы. Поиск. Решения.</b>	
<i>Сельникова О.П., Думанский В.Д., Моисеева А.В., Георгиевский В.П., Пиотровская А.Г., Крупа Н.А.</i> Иммунобиологические (биологические) препараты в национальных и межнациональных Фармакопеях .....	50
<i>Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Маслова Н.Ф., Пивень Е.П., Стангара В.М.</i> Защита прав интеллектуальной собственности в области создания лекарственных средств .....	67
<b>Синтез и изучение фармакологического действия</b>	
<i>Украинец И.В., Абдель Насер Х.Н. Дакках, Безуглый П.А., Горохова О.В., Сигоренко Л.В.</i> Синтез и биологические свойства 3',4'- дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот .....	71
<b>Получение лекарственных и вспомогательных веществ</b>	
<i>Зайцев А.И.</i> Изучение технологических факторов создания комплексной лекарственной субстанции пролонгированного действия «Декаеол» на основе синтетических алюмосиликатов .....	75
<b>Биотехнологические исследования</b>	
<i>Иванов Л.В., Бызов В.В., Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е.</i> Некоторые биофармацевтические свойства экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки .....	78
<b>Стандартизация лекарственных средств</b>	
<i>Котова Э.Э., Зинченко А.А., Куликов А.Ю., Котов А.Г., Хованская Н.П., Дячок В.В.</i> К вопросу о методах стандартизации рыбьего жира. Определение жирнокислотного состава и количественного содержания витамина D <sub>3</sub> в рыбьем жире .....	83
<i>Ковалева А.М., Георгиевский Г.В., Ковалев В.Н., Комиссаренко А.Н., Тимченко Н.М.</i> Разработка методов стандартизации нового лекарственного средства пифламин .....	92
<b>Готовые лекарственные средства</b>	
<i>Спиридонов В.Н., Кобзарь А.И., Чуешов В.И., Спиридонов С.В., Беликов В.В., Шермухамедова О.Г.</i> Сушка и деконтаминация гранул на основе активированных порошков семян каштана конского и отрубей пшеничных .....	97
<i>Белоконь И. Ф.</i> Влияние вспомогательных веществ на противомикробную активность нитазола .....	101
<b>Растительные препараты и их фармакологическое действие</b>	
<i>Абу Захер Кхалед, Журавлев Н.С., Мартынов А.В.</i> Изучение фотодинамической противоопухолевой активности суммы катехинов и лейкоантоцианидинов видов рода щавель .....	105

## У ДП «Науково - експертний фармакопейний центр»

4-5 квітня 2002 року в м. Харків ДП «Науково-експертний фармакопейний центр» провів інформаційно-консультативний семінар

### Біологічні методи контролю якості ліків відповідно до вимог Державної Фармакопеї України

Метою семінару було ознайомлення з вимогами Державної Фармакопеї України щодо біологічних методів контролю лікарських засобів у виконанні Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 95 від 12.03.2001 року "Про затвердження і введення в дію Державної Фармакопеї України (1 видання)" та Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 281 від 11.07.2001 року "Про запровадження Державної Фармакопеї України 1 видання".

У роботі семінару брали участь представники Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України, Державного фармакологічного центру МОЗ України, лабораторій з контролю якості лікарських засобів, вітчизняних фармацевтичних підприємств.

Роботою семінару керував директор ДП "Науково-експертний фармакопейний центр" *Георгієвський В.П.*

Із доповідями на семінарі виступили *Варченко В.Г.*, Перший заступник Головного державного інспектора України з контролю якості лікарських засобів, *Бондарева Л.В.*, начальник Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів у Харківській області.

На семінарі були заслухані доповіді:

**Біологічні методи контролю якості ліків у Державній Фармакопеї України – загальна характеристика та перспективи розвитку** (доповідач *Чайка Л.О.*, провідний науковий співробітник лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, канд. мед. наук)

**Пірогени** (доповідач *Гомон О.М.*, ст. наук. співробітник лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, канд. біол. наук)

**Бактеріальні ендотоксини** (доповідач *Меркулова Ю.В.*, наук. співробітник лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ)

**Аномальна токсичність** (доповідач *Гомон О.М.*, ст. наук. співробітник лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, канд. біол. наук)

**Депресорні речовини** (доповідач *Меркулова Ю.В.*, наук. співробітник лабораторії фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ)

У представлених доповідях поряд з інформацією про шляхи розвитку та нові тенденції у біологічних випробуваннях лікарських засобів був наданий порівняльний аналіз біологічних методів контролю якості лікарських засобів у ДФУ та провідних Фармакопеях світу (Американській, Європейській, Британській). Доповіді "Пірогени", "Бактеріальні ендотоксини", "Аномальна токсичність", "Депресорні речовини" супроводжувалися демонстрацією методології проведення наведених випробувань відповідно до вимог ДФУ.

Також була заслухана доповідь **Лабораторні тварини для біологічних методів контролю якості ліків – вимоги до утримання** (доповідач *Тутов М.М.*, зав. віварієм ДП НЕФЦ). Учасники семінару мали змогу практично ознайомитися з роботою віварію ДП НЕФЦ.

В обговоренні розглянутих на семінарі питань брали участь: *Гризодуб О.І.*, заступник директора ДП НЕФЦ із наукової роботи, доктор хім. наук, професор; *Хованська Н.П.*, зав. лабораторією фармакопейного аналізу ДП НЕФЦ, канд. фарм. наук, а також інші учасники семінару.

Для вивчення конкретних матеріалів Державної Фармакопеї України ДП "Науково-експертний фармакопейний центр" планує і надалі проводити практичні семінари з певних розділів ДФУ.

Георгиевский В.П.

Председатель Бюро Редакционной коллегии Государственной Фармакопеи Украины, директор Государственного предприятия «Научно-экспертный фармакопейный центр», Директор Государственного научного центра лекарственных средств МЗ и НАН Украины, доктор фарм. наук, профессор, заслуженный деятель науки и техники Украины, академик Международной инженерной академии

### **Роль Государственной Фармакопеи Украины как основного нормативного документа, регламентирующего качество лекарственных средств, в работе специалистов фармацевтической отрасли**

( Доклад на семинаре руководителей Государственной инспекции, лабораторий по контролю качества лекарственных средств. 28 - 31 января 2002 года, г. Харьков )

В октябре 2001 года приказом Министра здравоохранения Украины введено в действие первое издание Государственной Фармакопеи Украины, требования которой гармонизированы с требованиями Европейской Фармакопеи 3-го издания.

В соответствии с Законом Украины «Про лікарські засоби», статья 2, «Государственная Фармакопея Украины - это правовой акт, который содержит общие требования к лекарственным средствам и методики контроля их качества.»

Целью Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) является содействие сохранению здоровья граждан Украины посредством установления необходимого уровня требований, регламентирующих качество лекарственных средств. Чем выше уровень этих требований, тем выше гарантированная государством безопасность и качество лекарств, которыми Украина обеспечивает своих граждан.

17 мая 2001 года в Украине был утвержден Закон «О стандартизации». В соответствии со статьей 2 «действие закона не распространяется на фармацевтическую продукцию».

Под фармацевтической продукцией понимают продукцию, процессы и услуги, связанные с исследованием, разработкой, испытаниями, регистрацией, лицензированием, производством, хранением и распределением лекарственных средств, которые должны подлежать стандартизации, как и любая другая продукция.

Это требует создания Государственной системы стандартизации фармацевтической продукции.

Учитывая стратегию интеграции Украины в Европейское Сообщество (Постановление Кабинета Министров № 244 от 19.03.97), эта

система должна быть гармонизирована не только с системой стандартизации, принятой в Украине, но также с Европейскими и другими международными нормами.

В Европейском Союзе в сфере обращения лекарственных средств действуют следующие Правила управления лекарственными препаратами:

Том 1. Законодательство в области лекарственных средств. Лекарственные препараты для человека.

Том 2. Законодательство в области лекарственных средств. Информация для заявителей.

Том 2А. Процедуры предоставления торговой лицензии.

Том 2В. Представление и содержание доосье.

Том 2С. Информация для заявителей. Регламентирующие руководства.

Том 3. Лекарственные препараты для человека: Руководства.

Том 3А. Качество и биотехнология.

Том 3В. Безопасность, окружающая среда и информация о лекарственных препаратах.

Том 3С. Эффективность.

Том 4. Лекарственные препараты, предназначенные для человека и для использования в ветеринарии. Надлежащая производственная практика.

Следует отметить, что практически все перечисленные документы содержат ссылки на Европейскую Фармакопею. Таким образом, в Европейском Союзе построена система стандартизации лекарственных средств, в которую органично вписывается Европейская Фармакопея как сборник нормативов, определяющих качество лекарственных препаратов, их компонентов и контейнеров для них, служащая для максимального облегче-

ния движения препаратов внутри Европейского Союза.

В настоящее время рядом приказов Министерства здравоохранения, подготовленных Государственным фармакологическим центром и зарегистрированных в Министерстве юстиции, в Украине практически создана правовая база для регистрации лекарственных средств (получения торговой лицензии). Приказом Министерства здравоохранения от 14.12.01 № 506 для добровольной сертификации утверждено Руководство 42-01-2001 «Лекарственные средства. Надлежащая производственная практика», полностью гармонизированное с аналогичным документом Европейского Союза.

Государственным научным центром лекарственных средств по заданию Государственного департамента по контролю за качеством, безопасностью и производством лекарственных средств и изделий медицинского назначения подготовлены к утверждению Руководство по надлежащей производственной практике активных фармацевтических ингредиентов и Руководство по надлежащей практике дистрибьюции, также полностью гармонизированные с документами Европейского Союза.

Государственной инспекцией по контролю качества лекарственных средств подготовлен ряд документов, направленных на создание правовой базы в сфере контроля обращения лекарственных средств, и приказом Министерства здравоохранения Украины № 497 от 12.12.01 утвержден Порядок запрещения (остановки) и изъятия из обращения лекарственных средств на территории Украины.

Таким образом, можно отметить, что в Украине создание правил управления лекарственными препаратами (системы стандартизации) находится на достаточно высоком уровне выполнения, и ГФУ, представляющая собой установленный в законодательном порядке, гармонизированный с Европейскими требованиями сборник нормативных документов, является важным компонентом общей системы, включающей процессы лицензирования, регистрации, инспектирования и обращения лекарственных средств, и способствует их проведению.

Необходимо отметить, что требования Европейской Фармакопеи применимы только к фармацевтической продукции, производящейся в соответствии с принципами и прави-

лами надлежащей производственной практики (НПП, GMP). В Украине еще не созданы условия для перехода на обязательное выполнение правил надлежащей производственной практики в сфере производства и реализации лекарственных средств, что приходится компенсировать более высокими требованиями к контролю качества готового продукта. Поэтому в ГФУ соответствующие статьи Европейской Фармакопеи дополнены требованиями, которые учитывают специфику современного состояния фармацевтического сектора Украины. Этим объясняется построение общих статей и частных монографий ГФУ в виде двух взаимосвязанных частей:

- первой – идентичной соответствующей статье Европейской Фармакопеи
- второй - национальной, которая отображает национальную специфику Украины.

**НАЗВАНИЕ**

(для монографий - на украинском, латинском и английском языках)

**ЧАСТЬ СТАТЬИ, ПОЛНОСТЬЮ ИДЕНТИЧНАЯ СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ СТАТЬЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕИ**

**N**

**НАЦИОНАЛЬНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ**

Аналогичная схема построения Фармакопей принята в странах Европейского содружества, например, Британская, Чешская и другие Фармакопеи.

Национальная часть статей ГФУ не противоречит европейской части.

Требования национальной части не распространяются на лекарственные средства, которые выпускаются в условиях GMP, признанных в Европейском Сообществе.

В том случае, когда лекарственное средство не производится в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики (НПП, GMP), установленными в Европейском Сообществе, к данному лекарственному средству дополнительно могут предъявляться требования, указанные в национальной части статьи. Национальная часть содержит также дополнительные информационные материалы и альтернативные методики.

Такая схема построения монографий и общих статей ГФУ позволяет поддерживать качество препаратов на должном уровне в период внедрения в Украине правил GMP.

В различных документах Европейского Союза по GMP, лицензированию, инспектированию, исследованию и контролю лекарственных средств приводятся ссылки на Европейскую Фармакопею или, в случае отсутствия таких ссылок, на национальные Фармакопеи, потому что требования Фармакопеи — это объективные государственные стандарты качества лекарственных средств и их компонентов. Эти стандарты являются обязательными для всех предприятий и учреждений, независимо от их формы собственности, разрабатывающих, изготавливающих, хранящих, контролирующих и применяющих лекарственные средства, что распространяется и на Украину.

Это подтверждено в письме Министерства юстиции Украины от 18.12.2001 года, № 33-7/1473, в котором указано: «Поскольку Государственная Фармакопея Украины 1 издания состоит из фармакопейных статей, которые в соответствии с Законом Украины «О лекарственных средствах» являются нормативно-техническими документами, этот акт не подлежит государственной регистрации в Министерстве юстиции в соответствии с Указом Президента Украины от 3.10.92 № 493 «О государственной регистрации нормативно-правовых актов министерств и других органов исполнительной власти» (с изменениями от 21.05.98 № 493), и может применяться без государственной регистрации.

В соответствии с положением о Министерстве здравоохранения Украины, утвержденным Указом Президента Украины от 24.07.2000 № 918/2000, решения Минздрава Украины, принятые в рамках его полномочий, являются обязательными для выполнения центральными и местными органами исполнительной власти, органами местного самоуправления, предприятиями, учреждениями, организациями всех форм собственности и гражданами».

Учитывая вышесказанное, все специалисты, работающие в фармацевтическом секторе, должны использовать в своей работе материалы ГФУ. Поэтому всем специалистам, работающим в сфере исследования, разработки, производства, хранения, распределения, экспертизы и контроля лекарственных средств необходимо изучать и уметь пользоваться Государственной Фармакопеей Украины.

Отечественные специалисты имеют многолетний опыт работы с Фармакопеями и на

своем опыте убедились, что Фармакопея - это настольная книга, постоянно необходимая в работе.

Концепция построения ГФУ была согласована Фармакопейным центром с Европейской Фармакопеей.

Следует отметить, что структура ГФУ имеет много общего, как со структурой Европейской Фармакопеи, так и со структурой Государственной Фармакопеи СССР XI издания (ГФ XI) и структурой Фармакопей других стран.

ГФУ состоит из следующих разделов:

- Общие замечания
- Методы анализа:
  - Оборудование
  - Физические и физико-химические методы
  - Идентификация
  - Испытания на предельное содержание примесей
  - Методы количественного определения
  - Биологические испытания
  - Биологические методы количественного определения
  - Фармако-технологические испытания
- Реактивы
- Общие тексты
- Монографии
- Общие статьи на лекарственные формы и субстанции.

Однако, ГФУ имеет существенные отличия от ГФ XI в методологических подходах, условиях проведения анализа, мотивировке регламентации, в общих статьях по физическим и физико-химическим методам анализа, по биологическим испытаниям и по фармако-технологическим испытаниям.

Так, раздел ГФУ «Испытание на предельное содержание примесей» отличается от аналогичного раздела ГФ XI не только гораздо большим количеством испытаний (этот раздел содержит такие методики, как «Определение антиоксидантов в жирных маслах», «Свободный формальдегид», «Остаточные количества этиленоксида и диоксана» и ряд других определений, отсутствующих в ГФ XI), но и методологическими подходами к определению предельного содержания примесей.

В ГФУ в отдельный раздел вынесены методики проведения фармако-технологических испытаний, подходы в проведении которых отличаются от ГФ XI.

В Раздел «Биологические испытания» включена статья «Бактериальные эндотоксины» — метод испытания, отсутствующий в ГФ XI.

В раздел «Методы анализа» включена статья «Валидация аналитических методик и испытаний», в которой описываются требования к валидации испытания в зависимости от его типа и используемого аналитического метода. Эта статья очень важна при разработ-

ке, производстве и регистрации лекарственных средств.

Учитывая различия требований ГФУ и ГФ XI, на которой сегодня базируется весь массив аналитической нормативной документации производителей, Министерством здравоохранения принято решение постепенного перехода на требования ГФУ.

1. В соответствии с Приказом Минздрава № 95:



**МІНІСТЕРСТВО ЮСТИЦІЇ  
УКРАЇНИ**

Україна, 01001, м.Київ  
вул. Городецького, 13  
Тел. (380-44) 229-66-64  
Факс (380-44) 229-56-31

*18.12.2001* № *33-7/1473*

На № \_\_\_\_\_

Щодо наказу МОЗ  
України від 12.03.2001  
№ 95

**Міністерство охорони  
здоров'я України**  
252021, м.Київ,  
вул.Грушевського,7

Міністерство юстиції розглянуло ваш запит щодо введення в дію Державної Фармакопеї України-1, затвердженої наказом МОЗ України від 12.03.2001 № 95, і повідомляє.

Міністерством юстиції було роз'яснено МОЗ України, що відповідно до пункту 5 Положення про державну реєстрацію нормативно-правових актів міністерств, інших органів виконавчої влади, органів господарського управління та контролю, що зачіпають права, свободи й законні інтереси громадян або мають міжвідомчий характер, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 28.12.92 № 731 (із змінами та доповненнями від 15.06.94 № 420 та від 16.10.98 № 1640), на державну реєстрацію не подаються акти нормативно-технічного характеру (державні стандарти, будівельні норми і правила, тарифно-кваліфікаційні довідники та інші).

Оскільки ДФУ-1 складається із фармакопейних статей, які відповідно до Закону України "Про лікарські засоби" є нормативно-технічними документами, цей акт не підлягає державній реєстрації в Міністерстві юстиції відповідно до Указу Президента України від 03.10.92 № 493 "Про державну реєстрацію нормативно-правових актів міністерств та інших органів виконавчої влади" (із змінами від 21.05.98 № 493), і може застосовуватись без державної реєстрації (лист Мин'юсту від 15.06.01 № 33-28-1664).

Відповідно до Положення про Міністерство охорони здоров'я України, затвердженого Указом Президента України від 24.07.2000 № 918/2000, рішення МОЗ України, прийняті в межах його повноважень, є обов'язковими для виконання центральними та місцевими органами виконавчої влади, органами місцевого самоврядування, підприємствами, установами, організаціями всіх форм власності і громадянами.

Заступник Державного  
секретаря

Л.М.Горбунова

- с 1 октября 2001 года предприятия могут вносить в свои АНД требования Государственной Фармакопеи Украины.

2. В соответствии с Приказом Минздрава № 281:

- с 1 апреля 2002 года все вновь вводимые или пересматриваемые АНД должны соответствовать требованиям Государственной Фармакопеи Украины; исключение делается для раздела 2.6.1 «Стерильность», который вводится с 1.01.2005 года;

- действующие АНД могут не пересматриваться на соответствие Государственной Фармакопее Украины до конца срока их действия;

- АНД бывшего СССР сохраняют свою силу до 1 января 2004 года.

Временной промежуток между введением в действие ГФУ и необходимостью соблюдения ее требований, предусмотренный вышеуказанными приказами Министерства здравоохранения, дает возможность специалистам фармацевтического сектора изучить материалы Государственной Фармакопеи Украины и подготовиться к работе в соответствии с ее требованиями.

Следует подчеркнуть значимость ГФУ для подготовки провизоров всех специальностей, работающих в аптеках, клиниках и, особенно, на предприятиях, производящих фармацевтическую продукцию. Включение в программу обучения студентов изучения требований ГФУ, гармонизированной с Европейской Фармакопеей, позволит сделать шаг в подготовке специалистов Украины для работы в создаваемой системе управления качеством лекарственных средств. Иностранцам студентам это позволит по окончании Национальной фармацевтической академии Украины работать в своих странах со знанием Европейских требований к качеству лекарственных средств.

Процесс освоения Государственной Фармакопеи Украины специалистами-фармацевтами не вызовет, на наш взгляд, больших затруднений, так как в ее создании принимали участие ведущие ученые академических и научно-исследовательских институтов, высших учебных заведений, представители передовых предприятий — производителей лекарственных средств, руководители организаций Министерства здравоохранения Украины и общественных организаций.

Гризодуб А.И.

доктор хим. наук, профессор, зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе

### **Проблемы обеспечения фармакопейного качества фармацевтических субстанций при изготовлении лекарственных средств в промышленности и в условиях аптек Украины**

( Доклад на семинаре руководителей Государственной инспекции, лабораторий по контролю качества лекарственных средств. 28 - 31 января 2002 года, г. Харьков )

Большинство субстанций, используемых для производства готовых лекарственных средств (ГЛС), ввозится в Украину из-за рубежа. Таким образом, проблема обеспечения качества этих субстанций при изготовлении ГЛС — это проблема качества самих ГЛС. Невозможно изготовить качественные ГЛС из некачественных субстанций или из субстанций, качество которых является неопределенным. К сожалению, нередко закупаются субстанции с неизвестными профилями примесей, что может влиять не только на токсичность, но и на само фармакологическое действие ГЛС. Более низкая эффективность

некоторых отечественных генериков по сравнению с зарубежными аналогами (т.е. их небиоэквивалентность) в значительной степени может быть вызвана именно этим фактором. Известны также случаи, когда субстанции (и произведенные из них ГЛС) не оказывали необходимого терапевтического эффекта, хотя полностью соответствовали АНД. Причина та же — неизвестный профиль примесей.

Поэтому, если мы хотим довести качество отечественных ГЛС до международных требований и выйти с ними на внешний рынок, нам необходимо решить проблему качества

субстанций. Во всех развитых странах главным инструментом решения этой проблемы является Фармакопея — субстанции, используемые для производства ГЛС, должны быть фармакопейного качества.

Основные вопросы обеспечения фармакопейного качества субстанций при производстве отечественных ГЛС можно сформулировать следующим образом:

А. Как обеспечивается фармакопейное качество субстанций при производстве ГЛС в странах Европейского Союза (ЕС), курс на интеграцию в который взяла Украина?

В. Что такое субстанции «фармакопейного качества» в соответствии с Государственной Фармакопеей Украины (ГФУ)?

С. Что делать в случае, когда субстанции произведены по нефармакопейным технологиям?

Д. Где мелкому производителю приобрести субстанции фармакопейного качества?

#### *А. Основные принципы обеспечения фармакопейного качества субстанций в странах ЕС*

1. Все субстанции, используемые для производства ГЛС, должны быть фармакопейного качества.

2. Субстанция фармакопейного качества — это субстанция, произведенная по «фармакопейным» технологиям и отвечающая требованиям соответствующей монографии Европейской Фармакопеи (ЕФ).

3. Субстанция может производиться по разным технологиям. Каждая технология характеризуется своим профилем примесей. При разработке монографии ЕФ учитываются профили примесей для технологий, информация о которых была представлена производителями в ЕФ. Данные технологии можно условно назвать «фармакопейными». Монография ЕФ контролирует примеси только этих фармакопейных технологий. Данные примеси конкретно перечислены в конце монографии ЕФ (принцип прозрачности монографии).

4. Примеси других («нефармакопейных») технологий монография ЕФ не контролирует. Поэтому сам по себе факт соответствия конкретной серии субстанции требованиям монографии ЕФ еще не означает, что данная субстанция имеет фармакопейное качество. Необходимо доказать, что она произведена по фармакопейной технологии.

5. Это доказательство осуществляется путем получения производителем субстанции в

ЕФ *Сертификата соответствия* его технологии монографии ЕФ. Для этого производитель представляет в ЕФ информацию о полном профиле примесей. После экспертизы материалов ЕФ выдает *Сертификат соответствия*, в котором указано, что «качество субстанции, произведенной по данной технологии, может существенным образом (возможны и дополнительные тесты) контролироваться по данной монографии ЕФ». В случае, когда технология является нефармакопейной и требований монографии ЕФ недостаточно, в *Сертификате* приводятся необходимые дополнительные тесты.

#### *А1. Вопросы регистрации субстанций в странах ЕС*

В процессе регистрации ГЛС заявитель в регистрационном досье указывает производителей субстанции (обычно не более 4) и представляет их *Сертификаты соответствия* монографии ЕФ. Регистрация субстанций таких производителей проводится вместе с регистрацией ГЛС. Сами по себе субстанции не регистрируются.

Система *Сертификатов* ЕФ имеет ряд преимуществ перед АНД на субстанции. Отметим главное из них. *Сертификаты* ЕФ не нуждаются в пересмотре. При изменении монографии ЕФ субстанция автоматически начинает контролироваться по новому изданию монографии. Это позволяет установить единую государственную систему обеспечения фармакопейных требований к субстанциям, используемым для производства ГЛС.

#### *А2. Срок годности субстанций в соответствии с практикой, принятой в странах ЕС*

Субстанции не являются готовыми лекарственными средствами. Это обуславливает коренное отличие их от ГЛС в понятии «срок годности».

ГЛС перед употреблением больным *не контролируется*, поэтому для ГЛС устанавливается срок годности (shelf-life), в течение которого производитель гарантирует соответствие его качества требованиям АНД. По истечении этого срока ГЛС не используется и подлежит уничтожению.

В отличие от ГЛС, субстанции обязательно *должны контролироваться* перед использованием для изготовления ГЛС. Поэтому для них срок годности имеет другой смысл — это тот срок (в принципе, он ничем не отличается от срока гарантии холодильника), в течение

ние которого производителю субстанции могут быть предъявлены претензии к качеству.

Субстанцию можно использовать и по истечении срока годности, если они соответствует АНД. Если, например, срок годности субстанции 2 года, а она по каким-то причинам пролежала 10 лет, после этого ее проанализировали и определили соответствие АНД, такую субстанцию можно использовать для изготовления ГЛС.

Все это верно только в том случае, если АНД (в частности, монография) отвечает принципу прозрачности (transparency), т.е. она контролирует весь профиль примесей, и эти примеси указаны в монографии. В противном случае такой подход неверен, поскольку в процессе хранения могут накапливаться примеси, не контролируемые АНД. Однако для субстанций фармакопейного качества этого быть не должно — в силу принципа прозрачности монографий.

### *А3. Микробиологическая чистота субстанций в соответствии с практикой, принятой в странах ЕС*

Субстанции не являются готовыми лекарственными средствами, поэтому ЕФ не устанавливает к субстанциям конкретные требования по микробиологической чистоте (МБЧ), которая должна быть такой, чтобы обеспечить необходимую МБЧ конечного продукта — ГЛС. И это правильно, поскольку одни субстанции используются в больших концентрациях для изготовления инфузионных растворов, а другие в дозе 0.1 мг - для приготовления таблеток. Естественно, что для обеспечения необходимого качества ГЛС требования по МБЧ для этих субстанций разные. И каждый производитель ГЛС имеет свои наработки, позволяющие ему устанавливать эти требования.

### *В. Что такое субстанции «фармакопейного качества» в соответствии с ГФУ?*

Качество субстанций в ГФУ регулируется требованиями общей статьи «Субстанции» и соответствующих монографий. ГФУ гармонизована с ЕФ, поэтому требования общей статьи «Субстанции» и монографий также гармонизованы с требованиями ЕФ и с ее основными принципами обеспечения фармакопейного качества субстанций, изложенными выше.

### *В1. Специфика отечественного рынка субстанций*

1. Украина пока не является привлекательным рынком для зарубежных производителей субстанций. Это приводит к тому, что их поставки на отечественный рынок осуществляют не производители, а посредники, которые зачастую не имеют необходимой информации о технологии производства субстанций и полном профиле примесей.

2. Сертификаты соответствия монографии ЕФ имеют единичные поставщики.

3. Отечественным предприятиям трудно диктовать поставщикам требования к сопроводительной документации в силу небольшого объема заказов. Поэтому обычно отсутствует информация о полном профиле примесей, т.е. качество субстанций является неопределенным. Важнейшим фактором является цена, которая для субстанций с неопределенным качеством существенно ниже цены субстанций фармакопейного качества.

4. Таким образом, в Украине, как правило, не выдерживается принцип прозрачности АНД — в большинстве случаев мы не знаем, какие примеси реально контролирует данная АНД.

5. В Украине действует магия «авторитетных Фармакопей». Выражение «субстанция соответствует ЕФ (или USP)» действует безотказно на всех: производителей ГЛС, регистрирующие и контролирующие органы. При этом никого не интересует, является ли технология производства данной субстанции фармакопейной, т.е. можно ли ее контролировать по монографии данной Фармакопеи. Объективно это было связано, прежде всего, с отсутствием ГФУ. В этой ситуации ведущие Фармакопеи давали хоть какую-то гарантию качества.

### *В2. Подход ГФУ к обеспечению качества субстанций в Украине*

В2-1. Общая статья ГФУ «Субстанции»

В ГФУ введена национальная общая статья «Субстанции», аналогов которой нет в других Фармакопеях. Она построена по материалам различных общих статей ведущих Фармакопей, прежде всего, ЕФ и Британской Фармакопеи. В этой общей статье изложены основные принципы обеспечения качества субстанций, перечислены показатели качества, которые должны включаться в АНД, дана характеристика этих показателей и рекомендации по их регламентации. Основная цель общей статьи «Субстанции» — дать ориентиры

качества субстанций для производителей ГЛС, регистрирующих и контролирующих органов.

### *B2-2. Вспомогательные вещества*

В общей статье ГФУ "Субстанции" четко указано, что требования к субстанции распространяются и на вспомогательные вещества. С точки зрения требований к качеству между ними и в самом деле нет принципиальной разницы. ЕФ предпринимает попытки создать отдельную общую статью «Вспомогательные вещества». Однако это очень сложная задача, поскольку необходимо контролировать те характеристики вспомогательных веществ, которые и делают их таковыми. Например, инертность (для всех), разрыхляющие свойства (для разрыхлителей), характеристики пленки (для пленкообразователей) и т.д. Поскольку эти характеристики являются достаточно неопределенными, в настоящее время целесообразнее рассматривать вспомогательные вещества вместе с субстанциями, что и делает ГФУ.

### *B2-3. Остаточные количества органических растворителей*

1. Монографии ГФУ на субстанции не являются документами прямого действия. По ним нельзя прямо контролировать качество субстанций, поскольку в национальную часть почти всех монографий введен раздел «Остаточные количества органических растворителей» со ссылкой на общую статью 5.4. В соответствии с этой общей статьей в субстанциях регламентируется содержание 25 органических растворителей. Но методику их анализа необходимо разрабатывать для каждого конкретного случая. Если не представлена никакая информация о профиле примесей в субстанции, необходимо контролировать все 25 растворителей. Поэтому надо или разрабатывать АНД на базе монографии, или делать анализ в аккредитованной лаборатории Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины (Госинспекции). Другим выходом является *Сертификат соответствия монографии ГФУ*.

2. Требование обязательного соответствия субстанций общей статье «Остаточные количества органических растворителей», введенное практически во все монографии ГФУ, позволяет существенно «цивилизовать» использование субстанций. Например, субстанция цефалексина вполне может соответ-

ствовать требованиям ЕФ и содержать 0.5% бензола, поскольку произведена по нефармакопейной технологии. Монография же ГФУ этого не допустит за счет обязательного контроля остаточных растворителей.

3. В п. 5 «Общие положения» общей статьи ГФУ «Субстанции» указано, что образцы всех серий субстанций, использованных для изготовления ГЛС, должны храниться на предприятии в течение не менее 2 лет после выпуска ГЛС. Это дает возможность контролирующим органам проверить их качество.

### *B2-4. Сертификат соответствия монографии ГФУ*

В настоящее время в Украине лишь единичные поставщики субстанций имеют Сертификаты соответствия монографии ЕФ. Поэтому для облегчения использования монографий ГФУ в общей статье «Субстанции», наряду с понятием «Сертификат соответствия монографии ЕФ», введено понятие «*Сертификат соответствия монографии ГФУ*».

Данный *Сертификат* является аналогом Сертификата ЕФ, но выдается уполномоченным органом Украины. Поэтому процедура его получения гораздо проще. Цель Сертификата та же – доказать, что субстанция произведена по фармакопейной технологии, и поэтому ее можно контролировать по монографии ГФУ.

Систему *Сертификатов соответствия монографии ГФУ* надо еще создать, что невозможно без тесного сотрудничества Фармакопейного центра, Фармакологического центра и Госинспекции.

*Сертификаты соответствия монографии ГФУ* должны входить в регистрационные досье вместо нынешних АНД. Это позволило бы наладить государственную систему обеспечения фармакопейного уровня требований к качеству субстанций – изменение требований ГФУ (дополнения к ГФУ предполагается издавать 1 раз в год) автоматически включаются в *Сертификаты соответствия*. Ведь в настоящее время требования к субстанциям не изменяются в течение всего срока действия регистрационного досье (5 лет), хотя за это время фармакопейные требования к качеству могут несколько раз (и очень существенно) повышаться.

### *В2-5. Срок годности субстанций в соответствии с ГФУ*

Учитывая, что принцип прозрачности АНД в Украине пока не реализуется, введение европейского подхода к сроку годности субстанций явно преждевременно. В то же время нельзя мириться с устаревшими требованиями ГСТУ 42-3-93. «Лекарственные средства. Порядок установления срока годности», в соответствии с которыми субстанции можно использовать для производства ГЛС только в том случае, если срок их хранения не превышает 20 %-30 % от срока годности. Зачем тогда нужен срок годности? Поэтому в ГФУ выбран компромиссный вариант: субстанции могут использоваться для изготовления ЛС на всем протяжении срока годности при условии их соответствия АНД.

### *В2-6. Микробиологическая чистота субстанций в соответствии с ГФУ*

В общей статье «Субстанции» указано, что МБЧ субстанций должна быть такой, чтобы обеспечить необходимую МБЧ конечного продукта — ГЛС. Это находится в полном соответствии с требованиями ЕФ. Однако в Украину ввозятся субстанции не только с неизвестным профилем примесей, но и произведенные не в условиях GMP, МБЧ которых может быть самой разной. Можно представить себе, к какому хаосу для производителей ГЛС привело бы отсутствие требований по МБЧ для таких субстанций — ведь собственных наработок по этому вопросу производители ГЛС пока, в основном, не имеют. Поэтому для таких субстанций (а их — подавляющее большинство) в национальной части общей статьи ГФУ 5.1.4. «Микробиологическая чистота лекарственных средств» установлены необходимые требования по МБЧ. Основная цель этих требований — помочь производителям ГЛС в выборе субстанций необходимого качества.

### *С. Что делать в случае, когда субстанции произведены по нефармакопейным технологиям?*

Этот случай в Украине является практически основным, поскольку информация о полном профиле примесей обычно отсутствует. Общая статья ГФУ «Субстанции», в соответствии с подходом ЕФ, предлагает выход и в этом случае.

1. В подразделе «Сопутствующие примеси» определено, что в АНД на субстанции должны быть указаны все примеси, контро-

лируемые данной АНД. Если субстанция содержит другую примесь на уровне *выше 0.1 %*, которая не регламентируется АНД, это может означать, что данная субстанция произведена по нефармакопейной технологии. Такая серия субстанции может использоваться *только после специального разрешения уполномоченного органа*, т.е. Госинспекции.

2. В подразделе «Остаточные количества органических растворителей» указано, что в уполномоченный орган необходимо подавать информацию о всех растворителях, используемых при производстве субстанции и обоснование растворителей, которые контролируются в АНД. Содержание остаточных количеств всех растворителей не должно превышать нормы общей статьи 5.4 «Остаточные количества органических растворителей». Наличие в субстанции других растворителей на уровне выше 10% этих норм является свидетельством того, что субстанция произведена по нефармакопейной технологии. Такая серия субстанции может использоваться *только после специального разрешения уполномоченного органа*, т.е. Госинспекции.

Таким образом, ГФУ предлагает путь использования субстанций, произведенных по нефармакопейным технологиям. При этом ключевая роль принадлежит Госинспекции.

### *Д. Где мелкому производителю приобрести субстанции фармакопейного качества?*

Полный анализ субстанций на соответствие АНД (в том числе, и ГФУ) — достаточно дорогое удовольствие, поскольку при этом обычно используются самые современные и дорогостоящие методы (ИК-спектроскопия, газовая и жидкостная хроматография и т.д.). Реально такой анализ обычно могут провести только в аккредитованных лабораториях Госинспекции и на достаточно крупных предприятиях, имеющих хорошее аналитическое оснащение. Остальные в той или иной степени работают по договорам. Стоимость полного анализа субстанций может достигать до нескольких тысяч гривен за 1 серию. Для крупных предприятий, использующих большие количества субстанций, это обычно не сказывается на стоимости конечной продукции. В случае же мелкого, и особенно аптечного, производства стоимость полного анализа субстанций может очень существенно повышать стоимость препарата. Для экстенпорального же производства в условиях аптек

проведение полного анализа субстанций совершенно нереально.

### *Предложения по обеспечению фармакопейного качества субстанций при аптечном производстве ЛС*

1. В соответствии с принципами GMP и требованиями ГФУ («Субстанции»: п.4 «Общие положения»), все субстанции, используемые для производства ГЛС, должны анализироваться перед закладкой. Как реализовать это положение в условиях аптек? Самый очевидный путь — использование субстанций, проанализированных в аккредитованных лабораториях Госинспекций. Закупки таких субстанций вполне можно было бы проводить централизованно (а затем распределять

по аптекам) через региональные структуры фармации или областные Госинспекции прямо на стадии анализа в аккредитованных лабораториях. В крайнем случае, аптеки могли бы сами закупать субстанции у поставщиков, имеющих сертификат анализа аккредитованной лаборатории Госинспекции. Такой сертификат мог бы быть действительным в течение определенного времени (например, 3 месяца).

2. Заводы обязаны проводить анализ субстанций перед производством ГЛС. Субстанции с сертификатом анализа такого предприятия (со сроком действия, например, 3 месяца) также могут быть использованы для аптечного приготовления.

Асмолова Н.Н.

канд. фарм. наук, руководитель группы «Общие статьи на лекарственные формы и фармако-технологические тесты» отдела ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## **Вопросы качества инфузионных растворов аптечного и промышленного производства с точки зрения Государственной Фармакопеи Украины**

( Доклад на семинаре руководителей Государственной инспекции, лабораторий по контролю качества лекарственных средств. 28 - 31 января 2002 года, г. Харьков )

Общие статьи на лекарственные формы и субстанции Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) устанавливают тот минимальный уровень требований, которому должны соответствовать лекарственные средства, находящиеся на фармацевтическом рынке Украины.

В ГФУ указано, что Государственная Фармакопея имеет законодательный характер. Ее требования, предъявляемые к лекарственным средствам, являются обязательными для всех предприятий и учреждений Украины, независимо от их формы собственности, изготавливающих, хранящих, контролирующих и применяющих лекарственные средства.

В связи с вышеизложенным, требования, предъявляемые к качеству инфузионных лекарственных средств аптечного приготовления и промышленного производства, не должны отличаться.

Инфузионные лекарственные средства описаны в статье ГФУ «Лекарственные средства для парентерального применения».

Парентеральные лекарственные средства ГФУ определяет как стерильные лекарственные средства, предназначенные для введения

путем инъекций, инфузий или имплантаций в организм человека или животного.

В ГФУ парентеральные лекарственные средства классифицированы как:

- инъекционные лекарственные средства;
- внутривенные инфузионные лекарственные средства;
- концентраты для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств;
- порошки для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств;
- имплантаты.

Для внутривенных инфузионных лекарственных средств в ГФУ дано следующее определение - это стерильные водные растворы или эмульсии с водой в качестве дисперсионной среды; они свободны от пирогенов и обычно изотоничны крови. Они преимущественно предназначены для применения в больших объемах. Внутривенные инфузионные лекарственные средства не содержат никаких антимикробных консервантов.

К внутривенным инфузионным лекарственным средствам можно отнести также

концентраты и порошки для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств.

Растворы для внутривенных инфузионных лекарственных средств оценивают в соответствующих условиях наблюдения, при этом они должны быть прозрачными и практически свободными от частиц.

Эмульсии для внутривенных инфузий не должны обнаруживать признаков расслоения.

Концентраты для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств представляют собой стерильные растворы, предназначенные для инъекций или инфузий после разведения. Концентраты перед применением разводят до указанного объема соответствующей жидкостью. После разведения полученный раствор должен соответствовать требованиям, предъявляемым к инъекционным или инфузионным лекарственным средствам.

Порошки для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств представляют собой твердые стерильные вещества, помещенные в контейнер. При встряхивании с указанным объемом соответствующей стерильной жидкости они быстро образуют прозрачный, свободный от частиц раствор или однородную суспензию. После растворения или суспендирования они должны соответствовать требованиям, предъявляемым к внутривенным инфузионным или инъекционным лекарственным средствам, соответственно.

Лиофильные препараты для парентерального применения рассматривают как порошки для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств.

Требования к производству вышеперечисленных парентеральных лекарственных средств, в том числе и инфузий, отражены в разделе «Производство».

Роль раздела «Производство» отмечена в статье 1.4. «Монографии», где указано, что информация, содержащаяся в этом разделе, касается некоторых важных аспектов процесса производства, однако она не обязательно исчерпывающая. Требования, приведенные в этом разделе, адресованы производителю. Они могут касаться процесса производства, его валидации и контроля, постадийного контроля, а также испытаний, которые производитель обязан проводить перед выпуском каждой серии продукта. Уполномо-

ченный орган может проконтролировать выполнение приведенных в этом разделе требований посредством проверки полученных от производителя данных, при инспектировании производства или при испытании соответствующих образцов.

ГФУ обращает внимание, прежде всего, на следующие аспекты производства парентеральных лекарственных средств, в том числе и производства инфузий:

- *содержание антимикробных консервантов.* Следует учесть, что в разделе «Внутривенные инфузионные лекарственные средства» отмечено: «Внутривенные инфузионные лекарственные средства не содержат никаких антимикробных консервантов.»

- *стерильность.* Лекарственные средства для парентерального применения изготавливают с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных препаратов и развитие в них микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи «Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).

- *вода, используемая в производстве лекарственных средств для парентерального применения.* Она должна соответствовать требованиям, указанным в статье «Вода для инъекций».

Дополнительно в разделе «Внутривенные инфузионные лекарственные средства. Производство» указано:

- при производстве внутривенных инфузионных лекарственных средств, содержащих диспергированные частицы, следует предусмотреть меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

- объем внутривенного инфузионного лекарственного средства в контейнере должен быть достаточным для введения номинальной дозы при обычном методе введения (2.9.17).

Качество воды для инъекций в соответствии с Европейской Фармакопеей регламентируется статьей «Вода для инъекций». Эта статья контролирует качество воды, которая используется как растворитель для препаратов для парентерального применения, и качество воды «in bulk», которая используется при производстве парентеральных лекарственных средств. В процессе производства воды для инъекций должны быть предприняты меры для контроля жизнеспособных микроорганизмов.

При нормальных условиях общее количество жизнеспособных микроорганизмов, определяемых в воде по статье 2.6.12, должно быть не более 10 в 100 мл (определение проводят методом мембранной фильтрации). В процессе производства воды для инъекций проводят контроль электропроводности (2.2.38) (при температуре 20 °С она должна составлять не более чем  $1.1 \mu\text{s} \cdot \text{см}^{-1}$ ) и контроль общего органического углерода (2.2.44) — не более 0.5 мг/л.

Основные показатели качества для воды «in bulk» по статье «Вода для инъекций» следующие: она должна соответствовать показателям качества, описанным для воды очищенной, содержание бактериальных эндотоксинов в ней должно быть не более 0.25 МЕ/мл. Вода очищенная — прозрачная, бесцветная жидкость без запаха и вкуса. Контроль конечного продукта «Вода очищенная, «in bulk» проводят по показателям: нитраты (не более 0.2 ppm), тяжелые металлы (не более 1 ppm), алюминий (определение проводят, если вода предназначена для растворов для диализа).

В Европейской Фармакопее 4-го изд. (ЕФ, 2002) описана вода для разбавления концентрированных растворов для гемодиализа. Статья на воду для разбавления концентрированных растворов для гемодиализа опубликована для информации. Аналитические методы и пределы, приведенные в этой статье, предназначены для валидации систем для производства воды (например, в больницах). Эту воду получают путем дистилляции, обратным осмосом, методом ионного обмена либо другим валидированным методом. Условия приготовления, транспортирования и хранения должны быть такими, чтобы обеспечить минимальный риск химического или микробиологического загрязнения. Помимо химических показателей (кислотность, щелочность, окисляемые вещества, хлориды, фториды, нитраты, сульфаты, алюминий, аммоний, кальций, магний, ртуть, тяжелые металлы, калий, натрий, цинк), эта вода контролируется на содержание бактериальных эндотоксинов и микробиологическую чистоту (общее число микроорганизмов — не более 100 в 1 мл (метод посева на чашки)).

Показатели, приведенные в разделе «Испытания» общих статей на готовые лекарственные формы, обязательны для контроля качества лекарственной формы.

В европейской части статьи «Парентеральные лекарственные средства» указаны

следующие обязательные испытания для всех парентеральных лекарственных средств:

бактериальные эндотоксины (2.6.14)/пирогены (2.6.8);

стерильность (2.6.1).

Порошки для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств дополнительно контролируют на однородность содержания (2.9.6) и однородность массы (2.9.5)

В национальной части перечень показателей качества, по которым обычно контролируют жидкие лекарственные средства для парентерального применения, расширен: описание, идентификация, прозрачность, цветность, pH, сопутствующие примеси, извлекаемый объем, стерильность, пирогены или бактериальные эндотоксины, аномальная токсичность, механические включения, количественное определение.

В порошках для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств дополнительно контролируют следующие показатели: время растворения, потеря в массе при высушивании или вода.

Для проведения испытаний «Прозрачность», «Цветность», «pH» при контроле порошков для инъекционных или внутривенных инфузионных лекарственных средств используют раствор лекарственного средства в том растворителе и той концентрации, которые указаны в инструкции для медицинского применения, если нет других указаний в частной статье.

Таким образом, спецификация для парентеральных лекарственных средств, независимо от того, какие действующие вещества входят в состав лекарственной формы и где она приготовлена: в аптеке или на промышленном производстве, должна содержать определенный набор показателей качества, причем испытания на бактериальные эндотоксины (2.6.14)/пирогены (2.6.8) и стерильность (2.6.1) являются обязательными.

Проведение контроля качества инфузионных лекарственных средств основывается как на использовании фармако-технологических тестов, так и на использовании других испытаний (стерильность, бактериальные эндотоксины (пирогены)).

Основные методы, описанные в общих статьях на фармако-технологические тесты, и указанные испытания гармонизованы среди 26 участников Европейской Фармакопеи и используются для создания, производства

и контроля качества лекарственных средств в Европейском Сообществе.

#### **Бактериальные эндотоксины (2.6.14)**

Испытание на бактериальные эндотоксины может заменить испытание на пирогены в следующих случаях:

- для препаратов, включенных в Фармакопею, если это испытание указано в монографии.

Европейская Фармакопея не содержит статьи на готовые лекарственные средства, за исключением нескольких статей, которые описывают требования к препаратам, качество которых существенно зависит от производственного процесса, например, вакцины, сыворотки, препараты крови. В этих статьях указано, какое испытание проводить (бактериальные эндотоксины или пирогены). В основном, предпочтение отдается определению бактериальных эндотоксинов.

- в любых других случаях, если условия и требования испытания указаны в частной статье (АНД).

Если указано испытание на бактериальные эндотоксины, испытание на пирогены не проводят при отсутствии других указаний в частной статье (АНД).

Остановимся на фармако-технологических испытаниях, используемых для контроля качества инфузионных лекарственных средств по таким показателям качества, как извлекаемый объем и механические включения.

#### **Извлекаемый объем (2.9.17)**

Для внутривенных инфузионных лекарственных средств определение извлекаемого объема проводят следующим образом.

Отбирают один контейнер. Переносят содержимое в сухой мерный цилиндр такой вместимости, чтобы определяемый объем заполнил не менее 40 % номинального объема цилиндра. Измеряют извлекаемый объем. Извлекаемый объем должен быть не менее номинального объема, указанного на контейнере.

В Государственной Фармакопее СССР 11-го изд. (ГФ XI) объем цилиндра, с помощью которого проводили определение извлекаемого объема, не указывался. В статье «Инъекционные лекарственные формы» записано: «В сосудах вместимостью до 50 мл и более наполнение проверяют калиброванным цилиндром при температуре  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ».

По ГФУ извлекаемый объем должен быть не менее номинального объема, указанного на контейнере. По ГФ XI объем раствора, выбранного из сосуда шприцем, после вытеснения воздуха и заполнения иглы или после выливания в цилиндр не должен быть меньше номинального. Таким образом, методика и требования по данному показателю качества в ГФ XI и в ГФУ не отличаются.

В ЕФ 2002 каких-либо изменений или дополнений по определению извлекаемого объема для инфузионных лекарственных средств не приведено.

Национальная часть статьи ГФУ «Извлекаемый объем» содержит следующее дополнение: каждый контейнер для инъекционных лекарственных средств наполняют объемом, превышающим номинальный. Рекомендованный избыточный объем приведен в таблице в национальной части статьи. Таблица внесена в соответствии с требованиями Фармакопеи США и совпадает с требованиями ГФ XI.

#### **Механические включения**

Определение механических включений описано в ГФУ в статьях:

2.9.19. Механические включения: невидимые частицы;

2.9.20. Механические включения: видимые частицы;

2.9.21. Механические включения: метод микроскопии.

Методики, приведенные в статьях 2.9.19 и 2.9.20, не отличаются от методик, указанных в Инструкции «Контроль лекарственных средств для парентерального применения на механические включения» (РД 42У-001-93).

*Механические включения: невидимые частицы (2.9.19).*

Механические включения инъекционных и внутривенных инфузионных растворов — это посторонние подвижные нерастворимые частицы, за исключением пузырьков газа, случайно присутствующих в растворах.

Лекарственные средства, для которых необходимо испытание на механические включения, и требования к содержанию механических включений указаны в соответствующей частной статье.

Для контроля невидимых частиц используют прибор, основанный на принципе светоблокировки, который позволяет автоматически измерять количество и размер частиц. Измерение механических включений проводят при прохождении испытуемого раствора в

вакууме с постоянной скоростью через кювету, расположенную между источником света (лампа накаливания) и фотодиодом.

Прибор калибруют, используя дисперсионные взвеси ФСО сферических частиц размером от 5 мкм до 25 мкм. Стандартные частицы диспергированы в воде, свободной от частиц. Необходимо избегать агрегации частиц дисперсионной фазы.

ФСО сферических частиц представляет собой набор, состоящий из 3 виал по 20 мл, 2 из которых содержат стандарт (EP CRS) дисперсии сферических частиц 10 мкм, и воду, свободную от частиц. Стоимость набора ФСО сферических частиц - 310 евро.

Воду, свободную от частиц, получают фильтрованием воды очищенной через фильтр с размером пор 0.22 мкм.

Контроль механических включений необходимо осуществлять в условиях, ограничивающих попадание механических включений, предпочтительно в зоне ламинарного потока воздуха.

В статье приведена методика подготовки посуды и оборудования для проведения испытания по контролю чистоты посуды и оборудования, а также само испытание. Приве-

дена методика определения механических включений: невидимых частиц.

*Механические включения: видимые частицы (2.9.20).*

Данное испытание предназначено для визуальной оценки качества парентеральных растворов по наличию видимых частиц. Могут быть использованы другие валидированные методы.

Оборудование для проведения испытания состоит из устройства для просмотра, включающего:

- матовый черный экран подходящего размера, находящийся в вертикальном положении;
- белый матовый экран соответствующего размера, находящийся в вертикальном положении, рядом с черным экраном;
- перемещаемый плафон, снабженный подходящим затемненным источником дневного света с подходящим отражателем (осветитель может состоять из двух флуоресцентных ламп по 13 Вт каждая, длиной 525 мм). Интенсивность освещения в точке контроля должна быть от 2000 люкс до 3750 люкс; для цветных стеклянных и пластмассовых кон-

Таблица

**Различия в условиях определения механических включений в парентеральных лекарственных средствах (Механические включения: видимые частицы (2.9.20))**

Требования ГФУ и ЕФ 2002	Требования Инструкции "Контроль качества лекарственных средств для парентерального применения на механические включения"	
<i>Время контроля</i>		
5 с перед белым экраном; 5 с перед черным экраном.	Для препаратов, полученных путем растворения твердого вещества в ампулах время просмотра каждого образца – от 10 с до 15 с; для окрашенных растворов – до 30 с.	
<i>Требования к освещению</i>		
Интенсивность освещения в точке контроля должна быть <i>от 2000 люкс до 3750 люкс</i> . Для цветных стеклянных и пластмассовых контейнеров предпочтительны значения, близкие к верхнему пределу.	Освещенность зоны контроля должна составлять <i>не менее 2000 люкс</i>	
Осветитель может состоять из <i>двух флуоресцентных ламп</i> по 13 Вт каждая, длиной 525 мм	Зона контроля должна быть освещена <i>электрической лампочкой накаливания</i> соответствующей мощности. Зависит от окраски растворов	
	бесцветные	60 Вт
	окрашенные	100 Вт

тейнеров предпочтительны значения, близкие к верхнему пределу.

Приведена методика проведения испытания.

Проведение испытания по статье ГФУ и описанное в Инструкции «Контроль лекарственных средств для парентерального применения на механические включения» (РД 42У-001-93) различаются по следующим параметрам: время проведения испытания и освещенность рабочего места (Табл.).

Национальная часть статей ГФУ на механические включения дополнена следующими одинаковыми требованиями: дополнительные условия проведения испытания и нормы контроля лекарственных средств для парентерального применения на наличие механических включений указаны в соответствующем нормативном документе.

В настоящее время таким нормативным документом является Инструкция «Контроль лекарственных средств для парентерального применения на механические включения» (РД 42У-001-93). По этой Инструкции контроль проводят как визуальным, так и инструментальным методом, но нормирование числа механических включений, определенных разными методами для препаратов разных объемов, различное.

В ЕФ 2002, в отличие от Европейской Фармакопеи 3-го изд. (ЕФ 1997) и ГФУ, в раздел «Испытания» статьи «Лекарственные средства для парентерального применения» включено испытание на механические включения, как общее для всех парентеральных лекарственных средств. В ЕФ 2002 в обязательных требованиях по механическим включениям указано, что растворы для инфузий или инъекций, применяемые для человека, объемом более 100 мл, должны выдерживать испытание на механические включения: невидимые частицы (2.9.19).

Статья 2.9.19 в ЕФ 2002 претерпела существенные изменения. В нее включены 2 метода определения механических включений: метод светоблокировки, который позволяет автоматически измерять количество и размер частиц, и метод микроскопии. Метод микроскопии полностью гармонизован с требованиями Фармакопеи США. В статье описана методика определения механических включений и даны рекомендации по подсчету частиц.

В статье 2.9.19 ЕФ 2002 приведено нормирование для механических включений, определяемых разными методами.

#### Метод светоблокировки

Тест 1А. Для инфузий и инъекций объемом более 100 мл в одной испытуемой единице. Среднее число частиц размером 10 мкм или более не должно превышать 25 на 1 мл и размером 25 мкм или более — 3 на 1 мл.

Тест 1В. Для инфузий и инъекций объемом менее 100 мл в одной испытуемой единице. Среднее число частиц размером 10 мкм или более не должно превышать 6000 на контейнер и размером 25 мкм или более — 600 на контейнер.

В соответствии с РД 42У-001-93:

- для препаратов большого объема в 1 мл препарата число частиц размером 5 мкм и более не должно превышать 100, в том числе, размером 25 мкм и более - 4.

- для препаратов малого объема число частиц размером 5 мкм и более, содержащихся в одной емкости, не должно превышать 10000, в том числе, размером 25 мкм и более - 1000 частиц.

#### Метод микроскопии

Тест 2 А. Для инфузий и инъекций объемом более 100 мл в одной испытуемой единице. Среднее число частиц размером 10 мкм или более не должно превышать 12 на 1 мл и размером 25 мкм или более — 2 на 1 мл.

Тест 2 В. Для инфузий и инъекций объемом менее 100 мл в одной испытуемой единице. Среднее число частиц размером 10 мкм или более не должно превышать 3000 на контейнер и размером 25 мкм или более — 300 на контейнер.

Таким образом, нормирование, приведенное в ЕФ 2002, более жесткое, чем в РД 42У-001-93. Контроль препаратов больших объемов на наличие механических частиц в будущем необходимо будет проводить только автоматическим методом, основанном на принципе светоблокировки, или методом, основанным на микроскопическом подсчете частиц.

*Механические включения: метод микроскопии (2.9.21).*

Данное испытание предназначено для установления природы частиц, которые могут присутствовать в растворе, и для определения их характеристик. Оно может указывать на возможный источник загрязнения. Эта информация позволит производителю принять меры для предотвращения загрязнений.

Методика проведения испытания аналогична методике, описанной в статье 2.9.19

«Механические включения. Невидимые частицы».

**Оценка результатов.** Если возможно, устанавливают природу обнаруженных частиц и определяют их характеристики. При необходимости число обнаруженных частиц регистрируют. Подробного описания как регистрировать частицы, в статье не приведено.

### Маркировка

В статье 1.4. «Монографии» указано: «Маркировка является предметом национальных законодательств, а также международных соглашений». Таким образом, информация в разделе «Маркировка» не претендует на полноту.

**Для инъекционных лекарственных средств указывают:**

на каждом контейнере название лекарственного средства, его концентрацию или активность, объем или массу, номер серии.

на этикетке дополнительно указывают:

- название и концентрацию действующих веществ для многокомпонентных препаратов;

- способ введения;

- стерильно;

- апирогенен или свободен от эндотоксинов;

- названия вспомогательных веществ;

- срок годности;

- условия хранения.

на этикетке лекарственных средств для парентерального применения в однодозовых контейнерах указывают, что любая оставшаяся порция содержимого не должна больше использоваться для применения.

**Для внутривенных инфузионных лекарственных средств:**

на этикетке дополнительно к маркировке, приведенной для инъекционных лекарственных средств, указывают:

- осмоляльность (осмолярность);

- состав препарата;

- ионный состав препарата в ммоль/л.

Одним из обязательных требований маркировки внутривенных инфузионных лекарственных средств является указание осмоляльности.

Осмоляльность — это показатель, позволяющий оценить суммарный вклад различных растворенных веществ в осмотическое давление раствора.

Приближенный расчет осмоляльности  $\xi_m$  водного раствора проводят по формуле:

$$\xi_m = \nu m \Phi,$$

где:

$\nu$  - суммарное число ионов, образующихся из одной молекулы растворенного вещества в результате диссоциации. В случае, если растворенное вещество не диссоциирует на ионы,  $\nu = 1$ ;

$m$  - моляльность раствора, т.е. число молей растворенного вещества на килограмм растворителя;

$\Phi$  - моляльный осмотический коэффициент, учитывающий взаимодействие между ионами противоположного знака в растворе и зависящий от величины  $m$ . По мере усложнения состава раствора усложняется и определение величины  $\Phi$ .

В настоящее время в комиссии Европейской Фармакопеи, занимающейся разработкой общих статей на лекарственные формы и фармакотехнологические испытания, находится проект статьи «Суспензии и эмульсии для инъекций». В ней, например, для эмульсий предлагается проводить следующие испытания: определение типа эмульсии, определение стабильности с использованием метода микроскопии, определение стабильности в зависимости от температуры, определение стабильности при центрифугировании, определение реологических свойств (вязкость (2.2.8)), консистенции (2.9.9.), определение pH, стерильности.

Таким образом, уровень требований к контролю качества инфузионных внутривенных лекарственных средств постоянно возрастает. Их контроль предполагает наличие специального оборудования, специальных условий для проведения некоторых испытаний (на стерильность, на наличие механических включений) и соответствующей квалификации сотрудников.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України/ Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. - 556 с.
2. United States Pharmacopeia, 23 ed.. - Rockville, 1990. - 2570 p.
3. European Pharmacopeia, 3<sup>rd</sup> ed. - Strasbourg, 1997. - 1799 p.
4. European Pharmacopeia, 4<sup>th</sup> ed. - Strasbourg, 2001. - 2416 p.
5. Государственная Фармакопея СССР /МЗ СССР. - 11-е изд. - Вып. 1. - М.: Медицина, 1987. - 336 с.
6. Государственная Фармакопея СССР /МЗ СССР. - 11-е изд. - Вып. 2. - М.: Медицина, 1990. - 400 с.
7. РД 42У-001-93. Инструкция. Контроль лекарственных средств для парентерального применения на механические включения.
8. Chemical Reference Substances. Infrared Reference Spectra. Biological Reference Preparations. Miscellaneous Reagents. Catalogue. - Strasbourg, 2001. - List No. 30. - 39 p.

## До видання Доповнення до Державної Фармакопеї України

Вашему вниманию предлагаются проекты общих статей 5.4 “Остаточные растворители” и 2.4.24 “Идентификация и контроль остаточных растворителей”, которые планируется включить в Дополнение к Государственной Фармакопее Украины (ГФУ) 1-го изд.

Исходные варианты проектов были представлены в отдел ГФУ доктором хим.наук., проф. А.И. Гризодубом (зам. директора ГП “НЭФЦ” по научной работе).

Ответственный исполнитель по отделу ГФУ – канд.хим.наук, ст.науч.сотр. И.С. Терно.

При доработке представленных проектов были учтены замечания и предложения эксперта – члена Редколлегии ГФУ, канд.хим.наук, зам. Главного государственного инспектора Украины по контролю качества лекарственных средств С.В. Сура.

В обсуждении отдельных разделов проектов статей участвовали: А.А. Зинченко (ст.науч.сотр. лаборатории фармакопейного анализа), канд.биол.наук О.И. Гомон (ст.науч.сотр. лаборатории фармакопейного анализа), канд.биол.наук Н.С. Никитина (зав. лабораторией лекарственной и промышленной токсикологии ГНЦЛС).

В представленных материалах затронуты актуальные вопросы, представляющие интерес для широкого круга специалистов в области синтеза субстанций, вспомогательных веществ и производства готовых лекарственных средств, а также контроля их качества.

Замечания и предложения к проектам статей Вы можете направлять в адрес ГП “Научно-экспертный фармакопейный центр” (отдел ГФУ) или журнала “Фармаком”. Приглашаем всех заинтересованных лиц к открытому обсуждению на Форуме сайта журнала «Фармаком» [Farmacomua.narod.ru](http://Farmacomua.narod.ru).

### ПРОЕКТ

## 5.4. ОСТАТОЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ

### **Регламентация остаточных растворителей в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах**

Международная конференция по гармонизации технических требований в отношении регистрации лекарственных средств для человека (ICH) приняла Руководство по регламентации примесей остаточных органических растворителей, устанавливающее пределы содержания растворителей, которые могут оставаться в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах в результате производственного процесса. Руководство, приведенное ниже, не распространяется на лекарственные средства, уже поступившие на рынок. Фармакопея, однако, применяет принципы, описанные в данном руководстве, ко всем субстанциям, вспомогательным веществам и готовым лекарственным средствам, независимо от того, являются или не являются они субъектом монографий Фармакопеи. Все субстанции и готовые лекарственные средства должны проверяться на содержание тех растворителей, которые могут в них присутствовать.

Если, применение растворителя класса 1 оправдано и разрешено, его содержание должно контролироваться в соответствующем разделе монографии.

Обычно монографии Фармакопеи не включают предельные испытания для конкретных растворителей класса 2, так как используемые в производстве растворители могут быть различными у разных производителей. Поэтому компетентные уполномоченные органы должны быть информированы о растворителях, используемых в производственном процессе. Эта информация также должна приводиться в досье, предоставляемом для получения сертификата соответствия монографии Фармакопеи, и указываться в этом сертификате.

Если в производственном процессе используются растворители только класса 3, для их контроля можно применять испытание на потерю в массе при высушивании, описанное в монографии. Если растворитель класса 3 имеет обоснованный и разрешенный предел

содержания более 0.5 %, для его контроля необходимо использовать селективный метод анализа. В этом случае предел содержания растворителя должен быть приведен в монографии, так как он относится к безводной и свободной от растворителя субстанции. Во всех случаях компетентные уполномоченные органы должны быть информированы об используемых растворителях. Для растворите-

лей класса 2 такая информация приводится в сертификате соответствия.

Для контроля остаточных растворителей классов 1 или 2 (или класса 3 с пределом концентрации более 0.5 %) следует использовать, по возможности, методологию, описанную в общей статье 2.4.24. В другом случае необходимо применять подходящую валидированную методику.

## **ПРИМЕСИ: РУКОВОДСТВО ПО РЕГЛАМЕНТАЦИИ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

**(CPMP/ICH/283/95)**

### **1. ВВЕДЕНИЕ**

### **2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РУКОВОДСТВА**

### **3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ**

#### **3.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ПО СТЕПЕНИ РИСКА**

#### **3.2. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

#### **3.3. ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИТЕЛЕЙ КЛАССА 2**

#### **3.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ И ИСПЫТАНИЯ**

#### **3.5. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ О СОДЕРЖАНИИ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

### **4. ПРЕДЕЛЫ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

#### **4.1. РАСТВОРИТЕЛИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОТОРЫХ СЛЕДУЕТ ИЗБЕГАТЬ**

#### **4.2. РАСТВОРИТЕЛИ, СОДЕРЖАНИЕ КОТОРЫХ ДОЛЖНО ОГРАНИЧИВАТЬСЯ**

#### **4.3. МАЛОТОКСИЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ**

#### **4.4. РАСТВОРИТЕЛИ, ДЛЯ КОТОРЫХ ОТСУТСТВУЮТ НЕОБХОДИМЫЕ ДАННЫЕ ПО ТОКСИЧНОСТИ**

### **ГЛОССАРИЙ**

### **ПРИЛОЖЕНИЕ 1. РАСТВОРИТЕЛИ, ВКЛЮЧЕННЫЕ В РУКОВОДСТВО**

### **ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

#### **A2.1: ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДЕЛАМ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ**

#### **A2.2: ОСТАТОЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ**

### **ПРИЛОЖЕНИЕ 3. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

### **1. ВВЕДЕНИЕ**

Целью данного руководства является рекомендация приемлемых для безопасности человека пределов содержания остаточных растворителей в лекарственных средствах. В руководстве рекомендуется использование менее токсичных растворителей и описыва-

ются токсикологически обоснованные пределы содержания некоторых из них.

Остаточные растворители в лекарственных средствах определяются в данном руководстве как летучие органические вещества, которые используются или образуются при производстве субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств.

Эти растворители полностью не удаляются при применяемом технологическом процессе. Выбор подходящего растворителя для синтеза субстанции может увеличить ее выход или обусловить такие характеристики, как кристаллическая форма, чистота и растворимость. Поэтому растворитель может иногда быть критическим параметром в процессе синтеза. Данное руководство не распространяется на растворители, используемые в качестве вспомогательных веществ или входящие в состав сольватов. Однако содержание растворителей в таких препаратах должно обосновываться и определяться.

Так как остаточные растворители не имеют терапевтического действия, адекватного действию лекарственного средства, они должны удаляться до такой степени, чтобы удовлетворять требованиям спецификаций, надлежащей производственной практики (GMP) или другим требованиям к качеству. Лекарственные средства должны содержать те уровни остаточных растворителей, которые подтверждены данными по безопасности. Следует избегать использования в производстве субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств некоторых растворителей, обладающих высокой токсичностью (класс 1, Табл. 1), если их применение не может быть достаточно обосновано с точки зрения оценки "риск — польза". Содержание некоторых растворителей, имеющих меньшую токсичность (класс 2, Табл. 2), должно ограничиваться, чтобы исключить потенциальные побочные эффекты. В тех случаях, когда это возможно практически, должны использоваться менее токсичные растворители (класс 3, Табл. 2). Полный перечень растворителей, включенных в данное руководство, представлен в Приложении 1. Этот список не является исчерпывающим, он может дополняться другими используемыми растворителями. Рекомендуемые пределы содержания остаточных растворителей классов 1 и 2, а также классификация растворителей могут меняться по мере поступления новых данных по их безопасности. Обоснование безопасности применения на рынке нового лекарственного средства, содержащего растворитель, отсутствующий в перечне растворителей (Приложение 1), может основываться на концепциях этого руководства или на концепциях квалификации примесей, изложенных в руководствах для субстанций (Q3A, "Примеси в новых субстанциях") или

для готовых лекарственных средств (Q3B, "Примеси в новых лекарственных препаратах"), или на концепциях, изложенных во всех трех руководствах.

## 2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РУКОВОДСТВА

Областью применения данного руководства являются остаточные растворители в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах. Если процесс производства или очистки может приводить к присутствию таких растворителей, их содержание следует контролировать. Необходимым является проведение испытаний только для тех растворителей, которые используются или образуются в процессе производства или очистки субстанций, вспомогательных веществ или готовых лекарственных средств. Для расчета пределов содержания остаточных растворителей возможно как проведение испытания непосредственно лекарственного средства, так и применение накопительного метода, основанного на информации о пределах содержания остаточных растворителей в исходных ингредиентах, использованных для получения данного лекарственного средства. Если рассчитанные пределы содержания равны или ниже значений, рекомендованных данным руководством, не требуется никаких испытаний лекарственного средства на остаточные растворители. Если рассчитанные пределы содержания превышают рекомендованные, следует установить, приводит ли процесс получения данного препарата к снижению концентрации соответствующего растворителя до приемлемой величины. Лекарственное средство должно также проверяться на содержание того растворителя, который используется в процессе его производства.

Данное руководство не применяется к новым субстанциям, вспомогательным веществам или готовым лекарственным средствам, используемым на стадии проведения клинических испытаний, а также к уже поступившим на рынок лекарственным средствам.

Данное руководство применимо ко всем дозированным формам и способам их применения. Более высокие пределы содержания остаточных растворителей могут быть обоснованы только при краткосрочном (30 сут и менее) или местном применении. Обоснование этих пределов должно проводиться для каждого конкретного случая.

Дополнительную информацию см. в Приложении 2.

### 3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

#### 3.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ПО СТЕПЕНИ РИСКА

Для описания пределов воздействия токсических веществ Международной программой по химической безопасности (IPCS) используется термин "допустимое суточное потребление" (TDI), а Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) и другими национальными и международными органами и организациями здравоохранения используется термин "приемлемое суточное потребление" (ADI). Чтобы избежать путаницы в похожих по определению, но различных по значению терминах, обозначающих предел воздействия для одного и того же вещества, в данном руководстве вводится новый термин - "разрешенное суточное воздействие" (PDE) - фармацевтически обоснованное потребление остаточных растворителей.

Остаточные растворители, описанные в данном руководстве, представлены в Приложении 1 с указанием общепринятых названий и структурных формул. По их возможной угрозе здоровью человека они классифицированы и разделены на три класса:

*Растворители класса 1.* Растворители, использования которых следует избегать.

Это растворители с известной канцерогенной активностью по отношению к организму человека, растворители с предполагаемой канцерогенной активностью и растворители, представляющие опасность для окружающей среды.

*Растворители класса 2.* Растворители, содержание которых должно ограничиваться.

Это растворители с негенотоксичной канцерогенной активностью по отношению к организму животных или растворители, которые могут вызывать другие необратимые эффекты, такие как нейротоксичность или тератогенность.

К этому классу относятся также растворители, для которых имеется предположение о других выраженных, но обратимых, видах токсичности.

*Растворители класса 3.* Малотоксичные растворители.

Это растворители с низким токсическим потенциалом по отношению к организму человека. Для них не требуется установления пределов воздействия, обоснованных информацией о риске для здоровья человека. Класс

3 растворителей имеет значение PDE, равное 50 мг в день и более.

#### 3.2. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Метод, используемый для установления разрешенного суточного воздействия остаточных растворителей, представлен в Приложении 3<sup>1</sup>.

#### 3.3. ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИТЕЛЕЙ КЛАССА 2

Для установления пределов содержания растворителей класса 2 могут быть использованы два подхода.

*Подход 1.* Использование пределов концентраций (в ppm), представленных в Табл. 2, которые были рассчитаны по уравнению (1), предполагая, что назначаемая доза препарата составляет 10 г в сутки.

$$\text{Концентрация (ppm)} = \frac{1000 \cdot \text{PDE}}{\text{доза}}$$

где:

*PDE* — разрешенное суточное воздействие, в мг/сутки;

*доза* — суточная доза лекарственного препарата, в г/сутки.

Эти пределы концентрации остаточных растворителей считаются приемлемыми для всех субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств. Поэтому данный подход может применяться, когда назначаемая суточная доза неизвестна или ограничена. Если содержание органических растворителей во всех вспомогательных веществах и субстанциях, входящих в состав препарата, соответствует значениям пределов концентраций, представленным в Табл. 2, эти компоненты препарата могут использоваться в любых соотношениях. Если назначаемая суточная доза лекарственного средства не превышает 10 г, не требуется никаких дополнительных вычислений. Для лекарственных средств, суточная доза которых превышает 10 г, следует использовать подход 2.

*Подход 2.* Не является необходимым, чтобы содержание органических растворителей в каждом компоненте лекарственного препарата соответствовало пределам концентраций, представленным для подхода 1. Для рас-

<sup>1</sup> Краткое изложение данных по токсичности, которые были использованы для установления пределов воздействия, опубликованных в *Pharmeuropa*, Vol. 9, № 1, Supplement, April 1997.

чета пределов концентраций остаточного растворителя в лекарственном препарате по уравнению (1), могут быть использованы значения PDE (мг/сутки), приведенные в Табл. 2, и известная суточная доза препарата. Такие пределы считаются приемлемыми при условии, что было показано, что содержание растворителя снижено до практически достигаемого минимума. Пределы должны быть реалистичными по отношению к аналитической точности, возможностям производства, приемлемым изменениям в производственном процессе и должны соответствовать современным стандартам производства.

Подход 2 заключается в суммировании количеств остаточного растворителя, присутствующего в каждом из компонентов лекарственного препарата. Сумма этих значений, рассчитанная на сутки, должна быть меньше PDE.

Рассмотрим пример использования подходов 1 и 2 для расчета пределов содержания остаточного ацетонитрила в лекарственном средстве. Разрешенное суточное воздействие ацетонитрила составляет 4.1 мг/сутки. При расчетах с использованием подхода 1 получаем значение предела концентрации, равное 410 ppm. Максимальная назначаемая суточная доза лекарственного препарата составляет 5.0 г. Данный препарат содержит два вспомогательных вещества. Состав лекарственного препарата и рассчитанный предел концентрации остаточного ацетонитрила представлены в следующей таблице:

Компонент	Содержание в препарате	Предел концентрации ацетонитрила	Суточное воздействие
Активная субстанция	0.3 г	800 ppm	0.24 мг
Вспомогательное вещество 1	0.9 г	400 ppm	0.36 мг
Вспомогательное вещество 2	3.8 г	800 ppm	3.04 мг
Лекарственный препарат	5.0 г	728 ppm	3.64 мг

Содержание органического растворителя во вспомогательном веществе 1 соответствует пределу, установленному с использованием подхода 1, но субстанция, вспомогательное вещество 2 и готовое лекарственное средство по содержанию остаточного ацетонитрила в целом не отвечают пределу, уста-

новленному с использованием подхода 1. Тем не менее содержание остаточного ацетонитрила в готовом лекарственном средстве соответствует пределу воздействия 4.1 мг/сут, установленному с использованием подхода 2, и, таким образом, соответствует рекомендации данного руководства.

Рассмотрим другой пример для ацетонитрила в качестве остаточного растворителя. Максимальная назначаемая суточная доза лекарственного препарата составляет 5.0 г, и он содержит два вспомогательных вещества. Состав лекарственного препарата и рассчитанный предел концентрации остаточного ацетонитрила представлены в следующей таблице:

Компонент	Содержание в препарате	Предел концентрации ацетонитрила	Суточное воздействие
Активная субстанция	0.3 г	800 ppm	0.24 мг
Вспомогательное вещество 1	0.9 г	2000 ppm	1.80 мг
Вспомогательное вещество 2	3.8 г	800 ppm	3.04 мг
Лекарственный препарат	5.0 г	1016 ppm	5.08 мг

Как видно, содержание остаточного ацетонитрила в препарате не отвечает пределам, установленным с использованием подхода 1 и подхода 2. Производитель может выяснить, снижается ли концентрация остаточного ацетонитрила в процессе производства данного препарата. Если концентрация остаточного ацетонитрила не снижается в процессе производства до разрешенного предела, производитель готового лекарственного средства должен предпринять другие меры для снижения концентрации остаточного ацетонитрила. Если все эти меры не позволяют снизить предел содержания остаточного растворителя, в исключительных случаях производитель может представить краткое изложение действий, осуществленных с целью снижения концентрации растворителя до требований данного руководства, и представить результаты анализа "риск — польза" с целью получения разрешения на использование препарата с более высоким содержанием остаточного растворителя.

### 3.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ И ИСПЫТАНИЯ

Для определения остаточных растворителей обычно используют хроматографические методы, например, газовую хроматографию. Для определения содержания остаточных растворителей могут использоваться любые подходящие методики, описанные в Фармакопях. В противоположном случае, производитель свободен в выборе наиболее подходящей валидированной аналитической методики для конкретного применения. Если присутствуют только растворители класса 3, возможно использование неспецифического метода, например, определения потери в массе при высушивании.

Валидация методик контроля остаточных растворителей должна соответствовать руководствам ИСН "Валидация аналитических методик" и "Валидация аналитических методик. Дополнение."<sup>2</sup>.

### 3.5. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ О СОДЕРЖАНИИ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Производителям лекарственных средств необходима определенная информация о содержании остаточных растворителей во вспомогательных веществах или субстанциях, чтобы определить, отвечают ли они требованиям данного руководства. Ниже приведены примеры информации, которая может предоставляться производителю лекарственного средства поставщиками субстанций или вспомогательных веществ. Возможен выбор наиболее подходящего варианта:

- присутствие только растворителей класса 3. Потеря в массе при высушивании составляет менее 0.5 %;

- присутствие только растворителей класса 2 – X, Y, ... Содержание указанных растворителей удовлетворяет пределам, установленным с использованием подхода 1 (должны быть названы растворители X, Y, ...);

- присутствие только растворителей классов 2 и 3. Содержание растворителей класса 2 удовлетворяет требованиям подхода 1, а содержание остаточных растворителей класса 3 ниже 0.5 %.

Если возможно присутствие растворителей класса 1, они должны быть идентифицированы и количественно определены. Фраза "возможно присутствие" относится к растворителю, используемому на последней стадии

производственного процесса и к растворителям, которые используются на более ранних стадиях и не удаляются последовательно посредством валидированной процедуры.

Если растворители классов 2 и 3 присутствуют в количестве, превышающем требования подхода 1 или 0.5 %, соответственно, они должны быть идентифицированы и количественно определены.

## 4. ПРЕДЕЛЫ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

### 4.1. РАСТВОРИТЕЛИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОТОРЫХ СЛЕДУЕТ ИЗБЕГАТЬ

Растворители класса 1 не должны использоваться в производстве субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств из-за их неприемлемой токсичности или вредного воздействия на окружающую среду. Однако, если невозможно избежать их использования при производстве лекарственного средства с сильно выраженным терапевтическим эффектом, содержание этих растворителей должно ограничиваться в соответствии с требованиями Табл. 1, если нет других указаний в частной статье. 1,1,1-трихлорэтан включен в Табл. 1, поскольку он представляет опасность для окружающей среды. Установленный для него предел содержания 1500 ppm основан на обзоре данных по безопасности.

Таблица 1  
Растворители класса 1, использования которых в производстве лекарственных средств следует избегать

Растворитель	Предел концентрации <sup>3</sup> (ppm)	Характеристика
Бензол	2	Канцерогенен
Четыреххлористый углерод	4	Токсичен и опасен для окружающей среды
1,2-Дихлорэтан	5	Токсичен
1,1-Дихлорэтан	8	Токсичен
1,1,1-Трихлорэтан	1500	Опасен для окружающей среды

### 4.2. РАСТВОРИТЕЛИ, СОДЕРЖАНИЕ КОТОРЫХ ДОЛЖНО ОГРАНИЧИВАТЬСЯ

Содержание растворителей, представленных в Табл. 2, из-за их токсичности должно быть ограничено в лекарственных средствах.

<sup>2)</sup> Также общей статье ГФУ 1-го изд. "Валидация аналитических методик и испытаний"

<sup>3)</sup> Пределы концентраций остаточных растворителей в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах

Величины PDE в таблице округлены с точностью до 0.1 мг/сутки, а значения концентраций — с точностью до 10 ppm. Установленные значения не связаны с требуемой точностью анализа. Точность должна определяться как часть валидации методики.

Таблица 2  
Регламентация растворителей класса 2 в лекарственных средствах

Растворитель	PDE (мг/сутки)	Предел концентрации (ppm)
Ацетонитрил	4.1	410
Гексан	2.9	290
N,N-Диметилацетамид	10.9	1090
N,N-Диметилформамид	8.8	880
1,2-Диметоксиэтан	1.0	100
1,4-Диоксан	3.8	380
Дихлорметан	6.0	600
1,2-Дихлорэтен	18.7	1870
Ксилол*	21.7	2170
Метанол	30.0	3000
Метилбутилкетон	0.5	50
N-Метилпирролидон	48.4	4840
Метилциклогексан	11.8	1180
2-Метоксиэтанол	0.5	50
Нитрометан	0.5	50
Пиридин	2.0	200
Сульфолан	1.6	160
Тетралин	1.0	100
Толуол	8.9	890
1,1,2-Трихлорэтен	0.8	80
Формамид	2.2	220
Хлорбензол	3.6	360
Хлороформ	0.6	60
Циклогексан	38.8	3880
Этиленгликоль	6.2	620
2-Этоксизэтанол	1.6	160

\* - обычно содержит 60 % м-ксилола, 14 % п-ксилола, 9 % о-ксилола и 17 % этилбензола.

#### 4.3. МАЛОТОКСИЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ

Растворители класса 3 (Табл. 3) могут рассматриваться как имеющие меньшую токсичность и представляющие меньший риск для здоровья человека. Класс 3 не включает растворители, известные как вредные для здоровья человека при пределах их содержания, обычно допускаемых в лекарственных средствах. Однако, долгосрочные испытания токсичности или канцерогенности для многих растворителей класса 3 отсутствуют. Имеющиеся данные показывают, что они менее токсичны в острых и краткосрочных испытаниях и дают отрицательный результат в генотоксических испытаниях. Считается, что суточное воздействие этих остаточных растворителей 50 мг/сутки и менее (что соответствует 5000 ppm или 0.5 % при определении

предела концентрации с использованием подхода 1) является приемлемыми без обоснования. Более высокие концентрации могут быть также допустимыми при условии, что они определяются возможностями производства и в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики (GMP).

Таблица 3  
Растворители класса 3, содержание которых должно ограничиваться требованиями GMP и другими требованиями к качеству

Растворитель	
Анизол	2-Метил-1-пропанол
Ацетон	Метилэтилкетон
1-Бутанол	Муравьиная кислота
2-Бутанол	Пентан
Бутилацетат	1-Пентанол
Гептан	1-Пропанол
Диметилсульфоксид	2-Пропанол
Изобутилацетат	Пропилацетат
Изопропилацетат	Тetraгидрофуран
Кумол	Уксусная кислота
Метилацетат	Этанол
3-Метил-1-бутанол	Этилацетат
Диметилвый эфир	Этиловый эфир
Метилизобутилкетон	Этилформиат

#### 4.4. РАСТВОРИТЕЛИ, ДЛЯ КОТОРЫХ ОТСУТСТВУЮТ НЕОБХОДИМЫЕ ДАННЫЕ ПО ТОКСИЧНОСТИ

Следующие растворители (Табл. 4) могут также представлять интерес для производителей субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств. Однако, для них нет необходимых токсикологических данных, которыми можно обосновать PDE. Производители должны сами представлять обоснование пределов содержания этих остаточных растворителей в лекарственных средствах.

Таблица 4  
Растворители, для которых отсутствуют необходимые данные по токсичности

Растворитель	
1,1-Диметоксиметан	Метилизопропилкетон
2,2-Диметоксипропан	Метилтетрагидрофуран
1,1-Диэтоксипропан	Петролейный эфир
Диизопропиловый эфир	Трихлоруксусная кислота
Изооктан	Трифторуксусная кислота

#### ГЛОССАРИЙ

*Генотоксичные канцерогены* - канцерогены, вызывающие рак посредством влияния на гены и хромосомы.

*LOEL* – аббревиатура минимального уровня, при котором эффект наблюдается.

*Минимальный уровень, при котором эффект наблюдается* – минимальная доза вещества в опыте или группе опытов, которая дает достоверное увеличение частоты или выраженности любого биологического эффекта в организме испытуемых людей или животных.

*Корректирующий коэффициент* – коэффициент, определяемый обоснованным заключением токсиколога и применяемый при экстраполяции данных по безопасности, полученных при испытании на животных, на человека.

*Нейротоксичность* – способность вещества вызывать побочные эффекты в нервной системе.

*NOEL* – аббревиатура уровня, при котором эффект не наблюдается.

*Уровень, при котором эффект не наблюдается* – максимальная доза вещества, которая не дает достоверного увеличения частоты или выраженности любого биологического

го эффекта в организме испытуемых людей или животных.

*PDE* – аббревиатура разрешенного суточного воздействия.

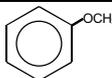
*Разрешенное суточное воздействие* – максимально допустимое потребление в сутки остаточного растворителя в лекарственных средствах.

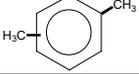
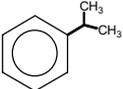
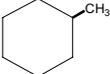
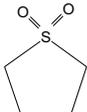
*Обратимая токсичность* – вредный эффект, вызываемый веществом, и исчезающий после прекращения воздействия данного вещества.

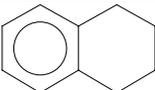
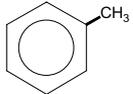
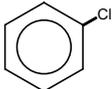
*Вещества с предполагаемой канцерогенной активностью по отношению к организму человека* – вещества, для которых не имеется эпидемиологических доказательств канцерогенеза, но имеются положительные данные по генотоксичности и очевидные доказательства канцерогенеза на грызунах.

*Тератогенность* – свойство вызывать структурные пороки развития эмбриона во время приема вещества в период беременности.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1  
РАСТВОРИТЕЛИ, ВКЛЮЧЕННЫЕ В РУКОВОДСТВО**

Название растворителя	Другие названия растворителя	Структурная формула	Класс
Анизол	Метоксибензол		3
Ацетон	2-Пропанон Пропан-2-он	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	3
Ацетонитрил		CH <sub>3</sub> CN	2
Бензол	Бензен		1
1-Бутанол	<i>n</i> -Бутиловый спирт Бутан-1-ол	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	3
2-Бутанол	втор-Бутиловый спирт Бутан-2-ол	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	3
Бутилацетат	Бутиловый эфир уксусной кислоты	CH <sub>3</sub> COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	3
трет-Бутилметилловый эфир	2-Метокси-2-метилпропан	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	3
Гексан	<i>n</i> -Гексан	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	2
Гептан	<i>n</i> -Гептан	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	3
N,N-Диметилацетамид	ДМА	CH <sub>3</sub> CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2
Диметилсульфоксид	Метилсульфинилметан Метилсульфоксид ДМСО	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	3
N,N-Диметилформамид	ДМФ	HCON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2
1,2-Диметоксиэтан	Диметиловый эфир этиленгликоля	H <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	2
1,4-Диоксан	<i>n</i> -Диоксан		2
Дихлорметан	Метиленхлорид	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
1,2-Дихлорэтан	<i>сис</i> -Дихлорэтан Этилендихлорид Этиленхлорид	CH <sub>2</sub> ClCH <sub>2</sub> Cl	1

1,1-Дихлорэтен	1,1-Дихлорэтилен Винилиденхлорид	$H_2C=CCl_2$	1
1,2-Дихлорэтен	1,2-Дихлорэтилен Ацетилендихлорид	$ClCH=CHCl$	2
Изобутилацетат	Изобутиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH_2CH(CH_3)_2$	3
Изопропилацетат	Изопропиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH(CH_3)_2$	3
Ксилол*	Диметилбензол		2
Кумол	Изопропилбензол (1-Метилэтил) бензол		3
Метанол	Метилловый спирт	$CH_3OH$	2
Метилацетат	Метилловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH_3$	3
3-Метил-1-бутанол	Изоамиловый спирт Изопентилловый спирт 3-Метилбутан-1-ол	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	3
Метилбутилкетон	2-Гексанон Гексан-2-он	$CH_3(CH_2)_3COCH_3$	2
Метилизобутилкетон	4-Метилпентан-2-он 4-Метил-2-пентанон МИБК	$CH_3COCH_2CH(CH_3)_2$	3
2-Метил-1-пропанол	Изобутиловый спирт 2-Метилпропан-1-ол	$(CH_3)_2CHCH_2OH$	3
N-Метилпирролидон	1-Метилпирролидин-2-он 1-метил-2-пирролидинон		2
Метилциклогексан	Циклогексилметан		2
Метилэтилкетон	2-Бутанон МЭК Бутан-2-он	$CH_3CH_2COCH_3$	3
2-Метоксиэтанол	Метилцелозольв	$CH_3OCH_2CH_2OH$	2
Муравьиная кислота		$HCOOH$	3
Нитрометан		$CH_3NO_2$	2
Пентан	n-Пентан	$CH_3(CH_2)_3CH_3$	3
1-Пентанол	Амиловый спирт Пентан-1-ол Пентилловый спирт	$CH_3(CH_2)_3CH_2OH$	3
Пиридин			2
1-Пропанол	Пропан-1-ол Пропиловый спирт	$CH_3CH_2CH_2OH$	3
2-Пропанол	Пропан-2-ол Изопропиловый спирт	$(CH_3)_2CHOH$	3
Пропилацетат	Пропиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COCH_2CH_2CH_3$	3
Сульфолан	Тетрагидротиофен--1,1-диоксид		2
Тetraгидрофуран	Тетраметиленоксид Оксациклопентан		3

Тетралин	1,2,3,4-Тetraгидронафталин		2
Толуол	Метилбензол		2
1,1,1-Трихлорэтан	Метилхлороформ	$\text{CH}_3\text{CCl}_3$	1
1,1,2-трихлорэтен	Трихлорэтен	$\text{HCCl-CCl}_2$	2
Уксусная кислота	Этановая кислота	$\text{CH}_3\text{COOH}$	3
Формамид	Метанамид	$\text{HCONH}_2$	2
Хлорбензол			2
Хлороформ	Трихлорметан	$\text{CHCl}_3$	2
Циклогексан	Гексаметилен		2
Четыреххлористый углерод	Тетрахлорметан	$\text{CCl}_4$	1
Этанол	Этиловый спирт	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	3
Этилацетат	Этиловый эфир уксусной кислоты	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	3
Этиленгликоль	1,2-Дигидроксиэтан 1,2-Этандиол	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	2
Диэтиловый эфир	Этоксизтан 1,1'-Оксибисэтан	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$	3
Этилформиат	Этиловый эфир муравьиной кислоты	$\text{HCOOCH}_2\text{CH}_3$	3
2-Этоксизтанол	Целозольв	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	2

<sup>1)</sup> - обычно содержит 60 % м-ксилола, 14 % п-ксилола, 9 % о-ксилола и 17 % этилбензола.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2 ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

### A2.1. ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДЕЛАМ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕГУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Некоторые летучие органические растворители, часто используемые в производстве лекарственных средств, внесены в качестве токсических веществ в перечень монографии "Критерии состояния окружающей среды" (ЕНС) и в "Информационную систему совокупного риска" (IRIS). В задачи таких организаций, как Международная программа по химической безопасности (IPCS), Агентство по защите окружающей среды Соединенных Штатов (US EPA) и Управление по пищевым продуктам и лекарственным средствам Соединенных Штатов (US FDA) входит определение пределов воздействия химических веществ. Их целью является защита здоровья человека и окружающей среды от возможного вредного влияния химических веществ при их долгосрочном воздействии. Методы оценки безопасных пределов воздействия химических веществ обычно основаны на

долгосрочных испытаниях. В том случае, когда результаты таких испытаний недоступны, могут использоваться результаты более краткосрочных испытаний с модификацией подхода, например, использование более высоких корректирующих коэффициентов. Подход, описанный в данном разделе, относится, главным образом, к долгосрочному воздействию и воздействию в течение жизни на основную часть населения таких факторов окружающей среды, как воздух, пища, питьевая вода и т.д.

### A2.2. ОСТАТОЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Пределы воздействия остаточных растворителей в данном руководстве устанавливались на основе методологии и данных по токсичности, описанных в монографиях ЕНС и IRIS. Однако при установлении пределов воздействия необходимо было сделать следующие предположения об остаточных растворителях, используемых в производстве лекарственных средств:

1) Пациенты (не основная часть населения) используют лекарственные средства для лечения заболеваний или для профилактики

с целью предотвращения инфекций или заболеваний.

2) Предположение о воздействии на пациентов в течении жизни не является необходимым для большинства лекарственных средств, но может оказаться полезным как рабочая гипотеза для снижения риска для здоровья человека.

3) Остаточные растворители являются неизбежными компонентами в фармацевтическом производстве и часто являются частью лекарственных средств.

4) Содержание остаточных растворителей не должно превышать рекомендуемые пределы, кроме исключительных случаев.

5) Данные токсикологических исследований, используемые для определения допустимых концентраций остаточных растворителей, должны быть получены с использованием соответствующих документов, описанных, например, в OECD и Красной Книге FDA.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3 МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для оценки риска канцерогенных растворителей класса 1 подходит метод Гейлора-Коделя (Гейлор Д.У. и Кодель Р.Л. "Алгоритм линейной интерполяции для низкодозовой оценки токсических веществ"). Лишь при наличии надежных данных по канцерогенности для установления пределов воздействия остаточных растворителей следует использовать экстраполяцию с помощью математических моделей. Пределы воздействия для растворителей класса 1 могут определяться также с использованием большого коэффициента корреляции (например, от 10000 до 100000) для минимального уровня, при котором эффект не наблюдается (NOEL). Обнаружение и количественное определение таких растворителей должно проводиться с помощью апробированных аналитических методов.

Для растворителей класса 2 пределы воздействия в данном руководстве были установлены с помощью вычисления значений PDE в соответствии с методиками установления пределов воздействия для лекарственных средств ("Pharmacopoeial Forum", Nov-Dec 1989) и методом, принятым IPCS для оценки риска воздействия химических веществ на здоровье человека (Критерии состояния окружающей среды, 170, ВОЗ, 1994). Эти методы подобны методам, используемым US EPA (IRIS) и US FDA (Красная Книга) и др. Метод,

представленный здесь, дан для лучшего понимания природы значений PDE. Для того, чтобы использовать значения PDE, указанные в разделе 4 этого документа, выполнять эти вычисления нет необходимости.

В большинстве опытов на животных PDE рассчитывают на основе максимального уровня, при котором эффект не наблюдается (NOEL) или исходя из минимального уровня, при котором эффект наблюдается (LOEL), по следующему уравнению:

$$PDE = \frac{NOEL \times \text{масса тела}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (1)$$

PDE рассчитывают, главным образом, на основе NOEL. Если NOEL не известен, используют LOEL. Корректирующие коэффициенты, предложенные здесь для отнесения данных по безопасности, полученных при испытании на животных, на человека, такого же типа, как и коэффициенты неопределенности, используемые в монографии "Критерии состояния окружающей среды" (Всемирная Организация Здравоохранения, Женева, 1994), и "корректирующие коэффициенты" или "коэффициенты безопасности" в материалах журнала "Pharmacopoeial Forum". Во всех вычислениях, независимо от способа введения лекарственного средства, используется предположение, что систематическое воздействие составляет 100 %.

Корректирующие коэффициенты представляют собой:

F1 - коэффициент экстраполяции между видами:

F1 = 2 - при экстраполяции данных, полученных при испытаниях на собаках, на человека;

F1 = 2.5 - при экстраполяции данных, полученных при испытаниях на кроликах, на человека;

F1 = 3 - при экстраполяции данных, полученных при испытаниях на обезьянах, на человека;

F1 = 5 - при экстраполяции данных, полученных при испытаниях на крысах, на человека;

F1 = 10 - при экстраполяции данных, полученных при испытаниях на других животных, на человека;

F1 = 12 - при экстраполяции данных, полученных для мышей на человека.

F1 учитывает относительную площадь поверхности (отношение массы тела испытуемого животного к массе тела человека). Площадь поверхности (S) вычисляют по форму-

ле:

$$S = k \cdot M^{0.67}$$

где  $M$  — масса тела, константа  $k$  принимается равной 10. Масса тела, используемая в этом уравнении, приведена в Табл. А3.1.

$F2 = 10$  - учитывает индивидуальную изменчивость. Для всех органических растворителей, используемых в данном руководстве, этот коэффициент обычно составляет 10.

$F3$  — коэффициент изменчивости для учета испытаний токсичности при краткосрочной нагрузке:

$F3 = 1$  - для испытаний, длительность которых равна, по крайней мере, половине продолжительности жизни животных (для грызунов и кроликов — 1 год, для кошек, собак и обезьян — 7 лет);

$F3 = 1$  - для испытаний репродуктивной токсичности, охватывающих весь период органогенеза;

$F3 = 2$  - для испытаний в течение 6 мес на грызунах или в течение 3.5 лет не на грызунах;

$F3 = 5$  - для испытаний в течение 3 мес на грызунах или в течение 2 лет не на грызунах;

$F3 = 10$  - для более краткосрочных испытаний.

Во всех случаях для испытаний, промежуточных по времени, используется больший коэффициент: например, для испытаний в течение 9 мес на грызунах используется коэффициент 2.

$F4$  — коэффициент, который может применяться при высокой токсичности растворителя, например, при негенотоксичной канцерогенности, нейротоксичности или тератогенности. В испытаниях репродуктивной токсичности используются следующие коэффициенты:

$F4 = 1$  - для эмбриотоксичности, связанной с материнской токсичностью;

$F4 = 5$  - для эмбриотоксичности, не связанной с материнской токсичностью;

$F4 = 5$  - для тератогенности, связанной с материнской токсичностью;

$F4 = 10$  - для тератогенности, не связанной с материнской токсичностью.

$F5$  — переменный коэффициент, который может применяться, если не установлен уровень, при котором эффект не наблюдается.

Если известен только LOEL, может использоваться коэффициент от 1 до 10, в зависимости от вида токсичности.

Допускается, что масса тела взрослого человека (независимо от пола) равна 50 кг. Эта относительно низкая масса тела обеспечива-

ет дополнительный коэффициент безопасности по сравнению со стандартной массой тела человека 60 кг или 70 кг, которые обычно используются при таких расчетах. Признано, что некоторые взрослые пациенты весят менее 50 кг; считается, что для этих пациентов учитываются другие коэффициенты, используемые при определении PDE. Если растворитель присутствует в составе препарата, предназначенного для педиатрии, следует сделать пересчет на более низкую массу тела.

В качестве примера применения уравнения (1) рассмотрим изучение токсичности ацетонитрила на мышах ("Pharmeutora", Vol. 9, No 1, Supplement, April 1997, page S24). Вычисленное значение для NOEL составляет  $50.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сутки}^{-1}$ . В этом случае PDE для ацетонитрила вычисляется следующим образом:

$$PDE = \frac{50.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сутки}^{-1} \times 50 \text{ кг}}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4.22 \text{ мг} \cdot \text{сутки}^{-1}$$

В этом примере:

$F1 = 12$  - при экстраполяции данных, полученных при испытании на мышах, на человека;

$F2 = 10$  - для учета индивидуальной вариабельности;

$F3 = 5$  - при продолжительности испытаний 13 недель;

$F4 = 1$  - если не наблюдалась выраженная токсичность;

$F5 = 1$  - если не установлен уровень, при котором эффект не наблюдается.

Таблица А3.1

**Данные, использованные для вычислений в этой статье**

Показатель	Значение
Масса крысы	425 г
Масса крысы (беременной)	330 г
Масса мыши	28 г
Масса мыши (беременной)	30 г
Масса морской свинки	500 г
Масса обезьяны резус	2.5 кг
Масса кролика	4 кг
Масса собаки (beagle)	11.5 кг
Потребление воздуха крысой	290 л/сутки
Потребление воздуха мышью	43 л/сутки
Потребление воздуха кроликом	1440 л/сутки
Потребление воздуха морской свинкой	430 л/сутки
Потребление воздуха человеком	28800 л/сутки
Потребление воздуха собакой	9000 л/сутки
Потребление воздуха обезьяной	1150 л/сутки
Потребление воды мышью	5 мл/сутки
Потребление воды крысой	30 мл/сутки
Потребление корма крысой	30 г/сутки

Для перевода единиц концентраций, использовавшихся в ингаляционных испытаниях, из ppm в мг/л или мг/м<sup>3</sup> применяли уравнение состояния идеального газа  $PV = nRT$ . В качестве примера рассмотрим влияние вдыхания четыреххлористого углерода (молекулярная масса 153.84) на репродуктивную токсичность ("Pharmeuropa", Vol. 9, No. 1, Supplement, April 1997, page. S9).

При этом для пересчета в мг/м<sup>3</sup>: 1000 л = 1 м<sup>3</sup>.

N

### 3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

#### 3.3. ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛОВ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИТЕЛЕЙ КЛАССА 2

*В случае присутствия одного остаточного растворителя класса 2*

*Подход 1.* Если содержание субстанции в единице готового дозированного лекарственного средства меньше 10 мг (D), предел концентрации растворителя класса 2 для данной субстанции ( $CL_x$ ) может быть увеличен по сравнению с пределом концентрации (CL), указанным в Табл.2, в K раз. K вычисляют по формуле:

$$K = \frac{CL_x}{CL} \leq \frac{10}{D} + 1, \\ CL_x \leq 5000 \text{ ppm (0.5\%)} \quad (2)$$

Если  $D \geq 10$  мг, то  $K = 1$ ,  $CL_x = CL$ .

Предел концентрации ( $CL_x$ ) остаточного растворителя, вычисленный по уравнению (2), не должен превышать 5000 ppm (0.5 %).

Например, если содержание субстанции в единице готового дозированного лекарственного средства не превышает 0.5 мг, то  $K = 21 \approx 20$ . При этом, например, предел концентрации хлороформа в ней может быть увеличен от  $CL = 60$  ppm (см. Табл. 3) до  $CL_x = 60 \cdot 20 = 1200$  ppm (0.12%).

Для инфузионных растворов, а также для готовых лекарственных средств с суточной дозой выше 10 г (например, сорбентов), необходимо дополнительно показать, что общее содержание остаточного растворителя в суточной дозе готового лекарственного средства не превышает PDE (Табл. 2).

*В случае присутствия нескольких остаточных растворителей класса 2*

Если в испытуемом веществе имеется  $n$  остаточных растворителей класса 2 с концент-

рациями  $C_{xi}$ , то величина  $C_{xi} / CL_{xi}$  представляет собой долю концентрации  $i$ -ого остаточного растворителя от значения предела концентрации  $CL_{xi}$ , рассчитываемого по уравнению (2). Сумма (X) всех таких долей остаточных растворителей в испытуемом веществе не должна превышать 1, т.е.

$$X = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{K \cdot CL_i} \leq 1$$

K вычисляют по уравнению (2), а для  $CL_i$  используют данные Табл. 2.

Например, величины  $CL_i$  для хлороформа, ацетонитрила и гексана, соответственно, равны 60 ppm, 410 ppm и 290 ppm. Реальная концентрация этих растворителей в субстанции составляет, соответственно, 30 ppm, 250 ppm и 100 ppm (т.е. субстанция выдерживает требования, приведенные в Табл. 2). Если содержание субстанции в единице готового лекарственного средства более 10 мг, то  $K = 1$ . В этом случае:

$$X = (30/60) + (250/410) + (100/290) = \\ 0.5 + 0.61 + 0.34 = 1.45 > 1,$$

так как  $X > 1$ , субстанция не выдерживает требований по содержанию остаточных растворителей. Если содержание субстанции в единице готового лекарственного средства равно, например, 5 мг, при вычислениях по уравнению (2)  $K = 3$ , а по уравнению (3)  $X = 0.48 < 1.0$ , т.е. субстанция выдерживает требования по содержанию остаточных растворителей.

*Подход 2.* Данный подход может использоваться для обоснования возможности применения субстанций и вспомогательных веществ с содержанием остаточного растворителя класса 2 большим, чем предел концентрации, приведенный в Табл. 2, для готового лекарственного средства. Если содержание остаточного растворителя в готовом лекарственном средстве удовлетворяет требованиям настоящей статьи, это является обоснованием возможности использования субстанций и вспомогательных веществ с данными пределами концентраций остаточных растворителей для получения готового лекарственного средства данного состава.

### 4. ПРЕДЕЛЫ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

#### 4.2. РАСТВОРИТЕЛИ, СОДЕРЖАНИЕ КОТОРЫХ ДОЛЖНО ОГРАНИЧИВАТЬСЯ

Содержание остаточных этиленоксида и 2-метилпиридина в субстанциях и готовых лекарственных средствах должно соответство-

вать требованиям, приведенным ниже, если нет других указаний в частной статье.

Таблица 2 (продолжение)

**Регламентация растворителей класса 2 в лекарственных средствах**

Растворитель	PDE (мг/сутки)	Предел концентрации (ppm)
Этиленоксид	-	10
2-Метилпиридин	-	500

**ПРОЕКТ**

**2.4.24. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОНТРОЛЬ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

Методики испытаний, описанные в данной общей статье, могут быть использованы:

- i. для идентификации большей части остаточных растворителей классов 1 и 2 в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах в тех случаях, если остаточные растворители неизвестны;
- ii. в качестве испытаний на предельное содержание растворителей классов 1 и 2, если они присутствуют в субстанциях, вспомогательных веществах и лекарственных препаратах;
- iii. для количественного определения растворителей класса 2 в том случае, когда пределы их содержания выше 1000 ppm (0.1 %) или, при необходимости, для количественного определения растворителей класса 3.

Остаточные растворители классов 1, 2 и 3 перечислены в проекте статьи 5.4. «*Остаточные растворители*».

Для приготовления испытуемых растворов ниже описаны три растворителя, а также приведены условия введения газовых проб при парофазной газовой хроматографии. Хотя описаны две хроматографические системы, предпочтительнее использовать систему А. Систему В применяют обычно только для идентификации. Выбор методики приготовления испытуемых растворов зависит от растворимости испытуемого вещества и, в определенных случаях, от типа контролируемого остаточного растворителя.

При обнаружении органических растворителей в описанных ниже условиях парофазного анализа могут возникать трудности для следующих остаточных растворителей: формамид, 2-этоксиэтанол, 2-метоксиэтанол, этиленгликоль, N-метилпирролидон и сульфолан. Для их контроля следует применять другие подходящие методики.

Когда описанную ниже методику испытаний применяют для количественного определения остаточных растворителей в конкрет-

ном веществе, она должна быть валидирована.

**МЕТОДИКА**

Анализ проводят методом парофазной газовой хроматографии (2.2.28).

**Пробоподготовка 1.** Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, растворимых в воде.

*Испытуемый раствор (1).* 0.200 г испытуемого образца растворяют в воде Р и доводят объем раствора тем же растворителем до 20.0 мл.

**Пробоподготовка 2.** Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, не растворимых в воде.

*Испытуемый раствор (2).* 0.200 г испытуемого образца растворяют в N,N-диметилформамиде Р (ДМФ) и доводят объем раствора тем же растворителем до 20.0 мл.

**Пробоподготовка 3.** Применяют при контроле N,N-диметилацетамида и/или N,N-диметилформамида, если известно или предполагается, что один или оба этих растворителей присутствуют в испытуемом образце.

*Испытуемый раствор (3).* 0.200 г испытуемого образца растворяют в 1,3-диметил-2-имидазолидиноне Р (ДМИ) и доводят объем раствора тем же растворителем до 20.0 мл.

Если не подходит ни одна из вышеперечисленных методик пробоподготовки, необходимо показать пригодность предлагаемых условий парофазного анализа.

*Раствор остаточного растворителя (a).* 1.0 мл ФСО раствора остаточного растворителя класса 1 доводят водой Р до 100.0 мл. 1.0 мл полученного раствора доводят водой Р до 10.0 мл.

*Раствор остаточных растворителей (b).* Подходящее количество остаточных растворителей класса 2 растворяют в диметилсульфоксиде Р и доводят объем раствора водой Р до 100.0 мл. Объем полученного раствора доводят водой Р до концентрации, равной 1/20

значений пределов концентрации, указанных в Табл. 1 или 2 проекта статьи 5.4. «Остаточные растворители».

**Раствор остаточных растворителей (с).** 1.00 г растворителя или растворителей, присутствующих в испытуемом образце, растворяют в *диметилсульфоксиде Р* или *воде Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 100.0 мл. Объем полученного раствора доводят тем же растворителем до концентрации, равной 1/20 значений пределов концентрации, указанных в Табл. 1 или 2 проекта статьи 5.4. «Остаточные растворители».

**Контрольный раствор.** Готовят аналогично *раствору остаточных растворителей (с)*, но без прибавления остаточных растворителей (применяют для проверки отсутствия мешающих пиков).

**Испытуемый раствор.** 5.0 мл раствора испытуемого образца и 1.0 мл холостого раствора помещают во флакон.

**Раствор сравнения (а) (класс 1).** 1.0 мл *раствора остаточного растворителя (а)* и 5.0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

**Раствор сравнения (а<sub>1</sub>) (класс 1).** 5.0 мл *раствора испытуемого образца* и 1.0 мл *раствора остаточного растворителя (а)* помещают во флакон.

**Раствор сравнения (b) (класс 2).** 1.0 мл *раствора остаточного растворителя (b)* и 5.0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

**Раствор сравнения (с).** 5.0 мл *раствора испытуемого образца* и 1.0 мл *раствора остаточного растворителя (с)* помещают во флакон.

**Раствор сравнения (d).** 1.0 мл холостого раствора и 5.0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

Флаконы закрывают плотными резиновыми мембранными пробками, покрытыми политетрафторэтиленом, и для закрепления обжимают алюминиевыми колпачками. Встряхивают до получения гомогенного раствора.

Для проведения парофазного анализа могут быть использованы следующие условия:

Параметры хроматографической системы	Методика пробоподготовки		
	1	2	3
Равновесная температура (°С)	80	105	80
Время достижения равновесия (мин)	60	45	45
Температура линии подачи газовой пробы (°С)	85	110	105
Газ-носитель: азот для хроматографии Р или гелий для хроматографии Р при соответствующем давлении			
Время нахождения под давлением (с)	30	30	30
Вводимый объем (мл)	1	1	1

Для проведения хроматографического анализа могут быть использованы следующие системы:

#### Система А:

- колонка кварцевая капиллярная размером 30 м × 0.32 мм или 30 м × 0.53 мм, покрытая слоем поперечносшитым полимером с 6 % полицианопропилфенилсилоксана и 94 % полидиметилсилоксана, толщина слоя 1.8 мкм или 3 мкм;

- газ-носитель: азот для хроматографии Р или гелий для хроматографии Р;

- деление потока 1:5;

- линейная скорость газа-носителя 38 см/с;

- пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 могут быть также использованы масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата;

- температуру колонки программируют: 40 °С — в течение 20 мин, затем повышение температуры со скоростью 10 °С/мин до 240 °С, при температуре 240 °С выдерживают в течении 20 мин;

- температура блока ввода пробы — 140 °С;

- температура детектора — 250 °С.

Если возможно влияние матрицы, используют систему В.

#### Система В

- колонка капиллярная кварцевая размером 30 м × 0.32 мм или 30 м × 0.53 мм, покрытая макроголом 20 000 Р, толщина слоя 0.25 мкм;

- газ-носитель: азот для хроматографии Р или гелий для хроматографии Р;

- деление потока 1:5;

- линейная скорость газа-носителя 35 см/с;

- пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 могут быть также использованы масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата);

- температуру колонки программируют: 50 °С — в течении 20 мин, затем повышение температуры со скоростью 6 °С/мин до 165 °С, при температуре 165 °С выдерживают в течение 20 мин;

- температура блока ввода пробы — 140 °С;

- температура детектора — 250 °С.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (а) вводят в колонку в условиях, описанных для системы А, и записывают хроматограмму таким образом, чтобы можно было измерить отношение сигнал/шум для 1,1,1-трихлорметана. Отношение

сигнал/шум должно быть не меньше 5. Типичная хроматограмма представлена на Рис. 2.4.24.-1.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (а,) вводят в колонку в условиях, описанных для системы А. Пики, отвечающие остаточным растворителям класса 1, должны быть еще обнаруживаемыми.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (b) вводят в колонку в условиях, описанных для системы А, и записывают хроматограмму таким образом, чтобы можно было определить коэффициент разделения пиков ацетонитрила и хлористого метилена. Хроматографическая система считается пригодной, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограммы, представленной на Рис. 2.4.24.-2, а коэффициент разделения пиков ацетонитрила и хлористого метилена должен быть не менее 1.0.

1 мл равновесной газовой фазы над испытуемым раствором вводят в колонку в условиях, описанных для системы А. Если на полученной хроматограмме нет пиков, соответствующих одному из пиков остаточных ра-

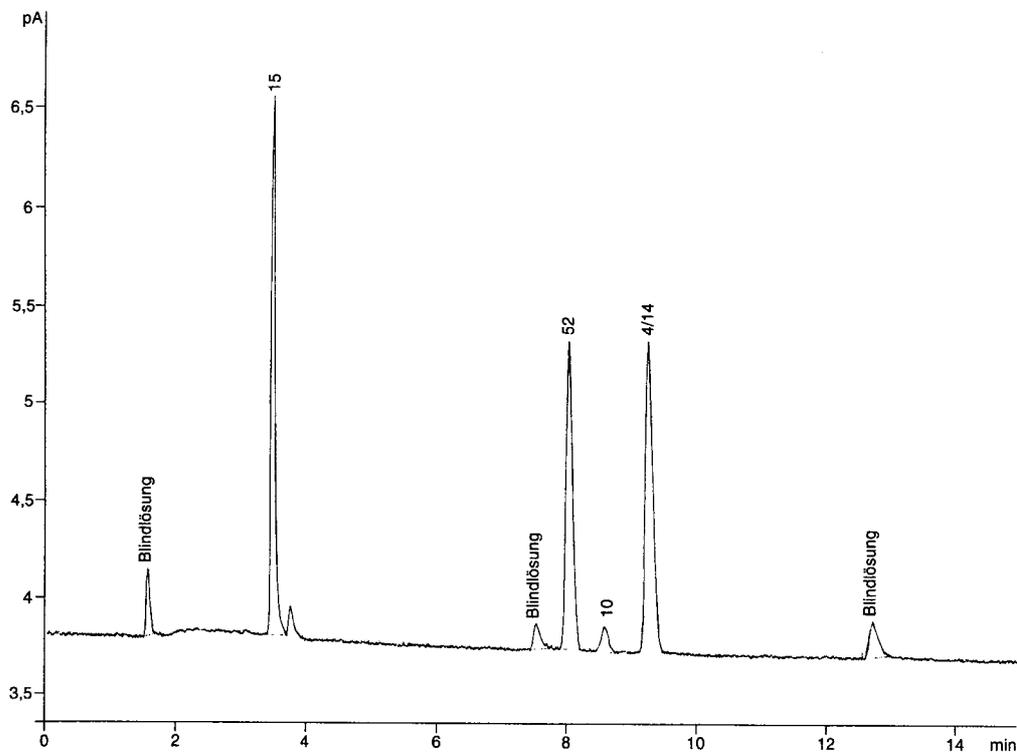
створителей на хроматограммах газовой фазы над растворами сравнения (а) или (b), вещество выдерживает испытание. Если какой-либо пик на хроматограмме газовой фазы над испытуемым раствором соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограмме газовой фазы над раствором сравнения (а) или (b), следует использовать систему В.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (а) вводят в колонку в условиях, описанных для системы В, и записывают хроматограмму таким образом, чтобы можно было измерить отношение сигнал/шум для бензола. Отношение сигнал/шум должно быть не менее 5. Типичная хроматограмма показана на Рис. 2.4.24.-3.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (а,) вводят в колонку в условиях, описанных для системы В. Должны обнаруживаться пики, соответствующие остаточным растворителям класса 1.

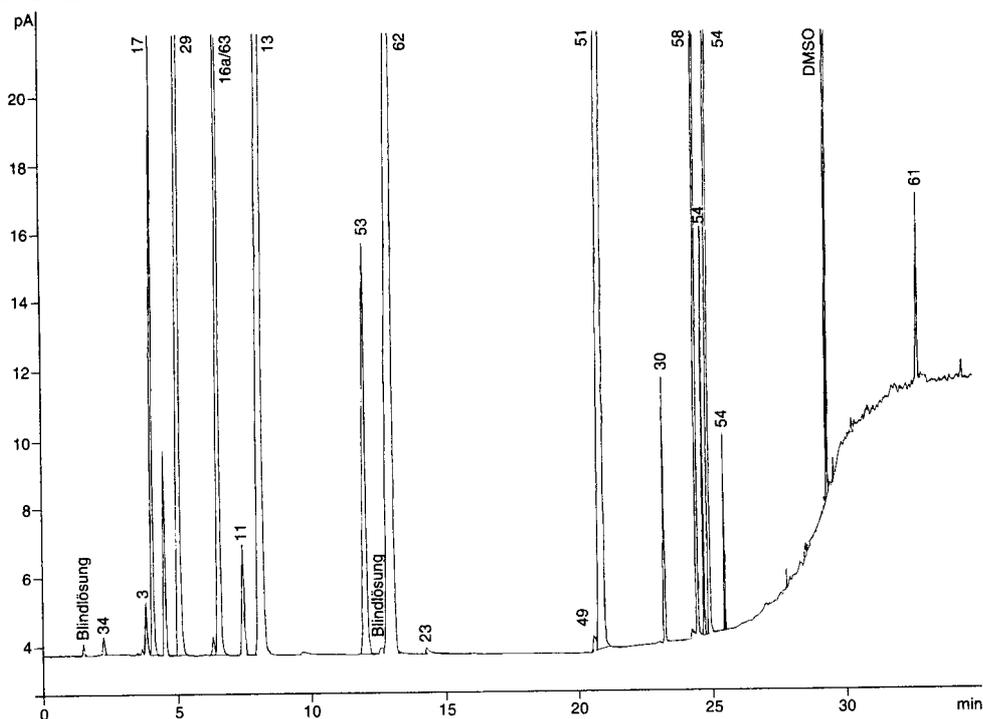
1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (b) вводят в колонку в условиях, описанных для системы В, и записыв-

Рисунок 2.4.24.-1.



Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы А и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор. 4 – бензол, 10 – четыреххлористый углерод, 14 – 1,2-дихлорэтан, 15 – 1,2-дихлорэтилен, 52 - 1,1,1-трихлорэтан.

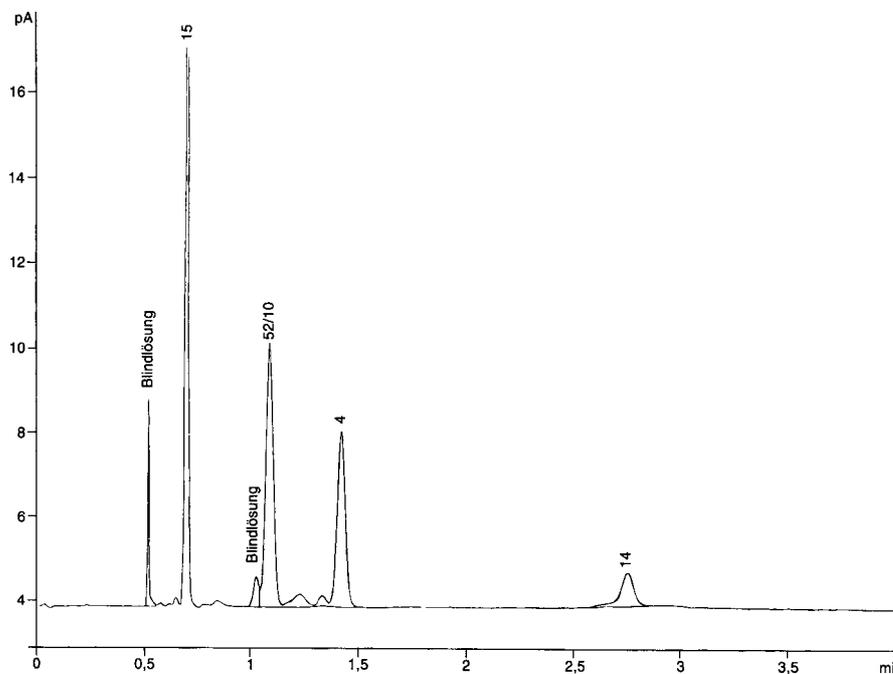
Рисунок 2.4.24.-2.



Хроматограмма остаточных растворителей класса 2 в условиях, описанных для системы А и прободготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.

3 – ацетонитрил, 11 – хлороформ, 13 – циклогексан, 16а - цис-1,2-дихлорэтилен, 17 – дихлорметан, 2 - гексан, 30 – 2-гексанон, 34 – метанол, 49 – пиридин, 51 – толуол, 53 – 1,1,2-трихлорэтилен, 54 – орто-, мета- и пара-ксилолы, 58 – хлорбензол, 61 – тетралин, 62 – метилциклогексан, 63 – нитрометан, 64 – 1,2-диметоксиэтан.

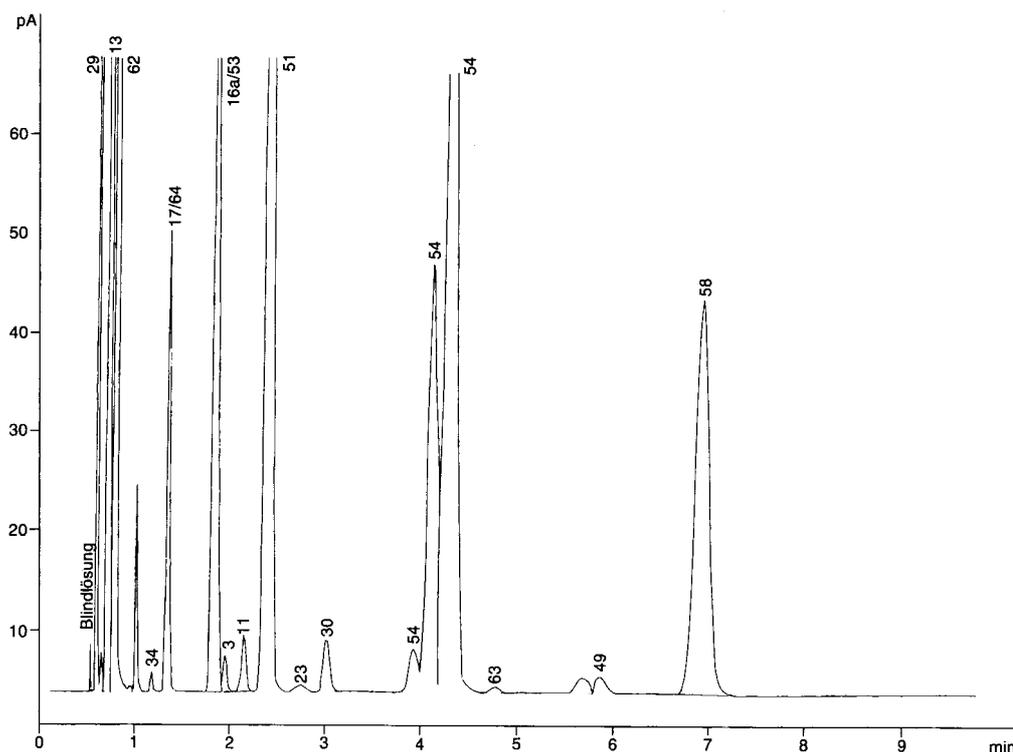
Рисунок 2.4.24.-3.



Хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы В и прободготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.

4 – бензол, 10 – четыреххлористый углерод, 14 – 1,2-дихлорэтан, 15 – 1,1-дихлорэтилен, 52 - 1,1,1-трихлорэтан.

Рисунок 2.4.24.-4.



Хроматограмма остаточных растворителей класса 2 в условиях, описанных для системы В и пробоподготовки 1.

Пламенно-ионизационный детектор.

3 – ацетонитрил, 11 – хлороформ, 13 – циклогексан, 16а - цис-1,2-дихлорэтилен, 17 – дихлорметан, 23 – 1,4-диоксан, 29 - гексан, 30 – 2-гексанон, 34 – метанол, 49 – пиридин, 51 – толуол, 53 – 1,1,2-трихлорэтилен, 54 – орто-, мета- и пара-ксилолы, 58 – хлорбензол, 61 – тетралин, 62 – метилциклогексан, 63 – нитрометан, 64 – 1,2-диметоксиэтан.

вают хроматограмму таким образом, чтобы можно было определить коэффициент разделения пиков трихлорэтилена и ацетонитрила. Хроматографическая система считается пригодной, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограммы, представленной на Рис. 2.4.24.-4, а коэффициент разделения пиков ацетонитрила и трихлорэтилена должен быть не менее 1.0.

1 мл равновесной газовой фазы над испытуемым раствором вводят в колонку, описанную для системы В. Если на полученной хроматограмме нет пиков, соответствующих одному из пиков остаточных растворителей на хроматограммах газовой фазы над растворами сравнения (а) или (b), вещество выдерживает испытание. Если какой-либо пик на хроматограмме газовой фазы над испытуемым раствором соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограмме газовой фазы над раствором сравнения (а) или (b), и это подтверждается при хромато-

рафировании в системе А, поступают следующим образом.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (с) вводят в колонку в условиях, описанных для системы А или системы В. Если необходимо, чувствительность системы регулируют таким образом, чтобы высота пика идентифицируемого остаточного растворителя или растворителей составляла не менее 50 % шкалы регистрирующего устройства.

1 мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (d) вводят в колонку. Не должно наблюдаться никаких мешающих пиков.

1 мл равновесной газовой фазы над испытуемым раствором и 1 мл газовой фазы над раствором сравнения (с) вводят в колонку не менее 3 раз.

Средняя площадь пика остаточного растворителя или растворителей на хроматограмме равновесной газовой фазы над испытуемым раствором не должна составлять бо-

лее половины площади пика остаточного растворителя или растворителей на хроматограмме равновесной газовой фазы над *раствором сравнения (с)*. Результаты испытания являются достоверными, если относительное стандартное отклонение разностей площадей пика анализируемого вещества, полученное из трех повторных парных введений равновесной газовой фазы над *раствором сравнения (а)* и испытуемым раствором, не превышает 15 %.

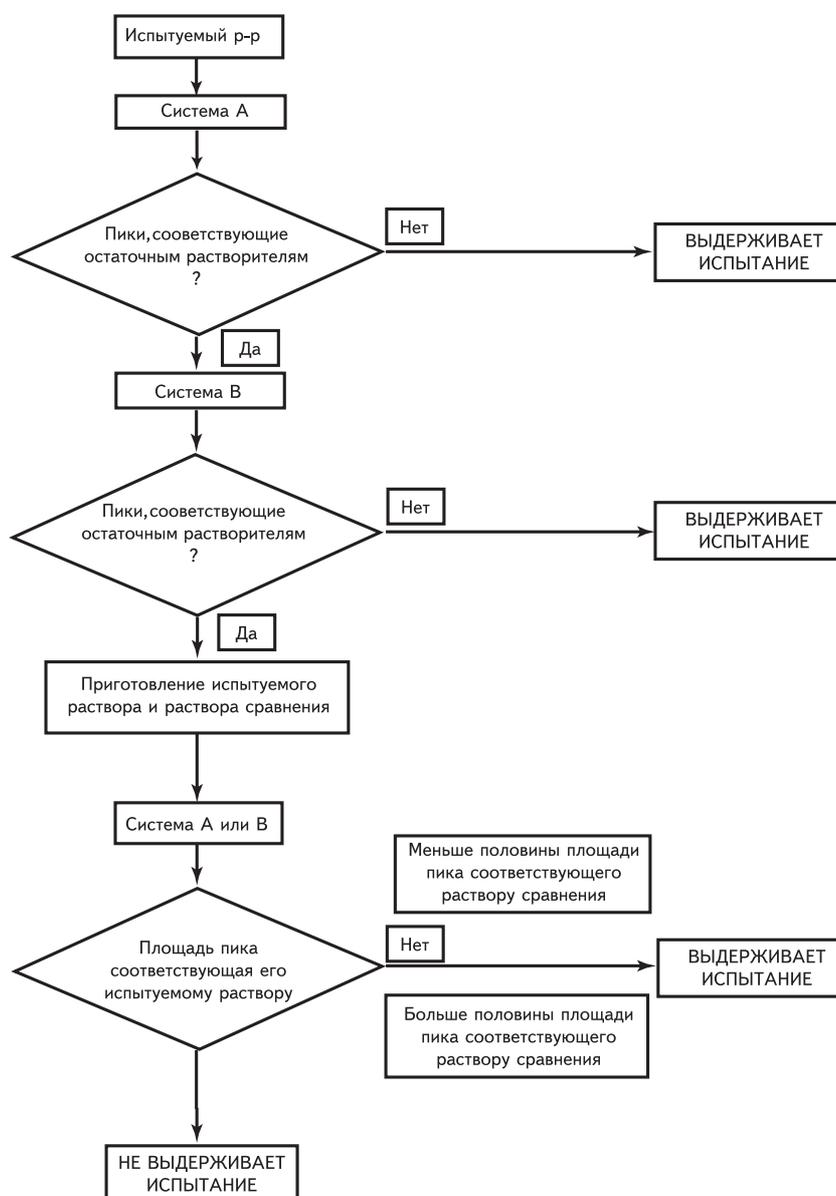
Схема проведения испытания представлена на Рис. 2.4.24.-5.

Если предел содержания остаточного растворителя (классов 2 или 3) составляет 0.1 % и более, для его количественного определения может быть использован метод стандартных добавок.

N

Для контроля остаточных растворителей могут быть использованы также любые другие валидированные методики.

Рисунок 2.4.24.-5.



Ход анализа при идентификации и проведении испытания на предельное содержание остаточных растворителей

**Определение дихлорметана в таблетках, покрытых оболочкой<sup>1</sup>**

*Требования к хроматографу.* Может быть использован газовый хроматограф с программированием температуры, снабженный:

- пламенно-ионизационным детектором;
- стеклянной колонкой размером 1.8 м × 2 мм, заполненной углеродом графитизированным для хроматографии Р с минимальной площадью 12 м<sup>2</sup>/г, содержащим 0.2 % нанесенного макрогола 1500 Р.

*Испытуемый раствор.* Около 1.0 г неизмельченных таблеток (таблетки, покрытые оболочкой предварительно надрезают) помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой, прибавляют 20 мл воды Р, помещают колбу в ультразвуковую баню и выдерживают до распадаения таблеток, после чего раствор центрифугируют. 2 мл полученного раствора помещают во флакон вместимостью 20 мл, снабженный резиновой мембранной пробкой, покрытой политетрафторэтиленом, и алюминиевым обжимным колпачком, и закупоривают. Флакон помещают на 20 мин в водяную баню с температурой 85 °С.

*Раствор сравнения 1.* 3.8 мкл (5 мг) дихлорметана помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл воды Р, доводят объем раствора водой Р до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор сравнения 2.* Раствор готовят аналогично испытуемому раствору, но вместо 20 мл воды Р используют 20 мл раствора сравнения 1.

Отбор газовой фазы осуществляют немедленно.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 3.1 мкл (2.5 мг) 96 % спирта этилового Р смешивают с 500 мл раствора сравнения 1.

Раствор используют свежеприготовленным.

2 мл полученного раствора помещают во флакон вместимостью 20 мл, снабженный резиновой мембранной пробкой, покрытой политетрафторэтиленом, и алюминиевым обжимным колпачком, и закупоривают. Флакон

помещают на 20 мин в водяную баню с температурой 85 °С.

Отбор газовой фазы осуществляют немедленно.

**Проверка пригодности хроматографической системы.** 1 мл равновесной газовой фазы над раствором для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют, получая не менее 6 хроматограмм в следующих условиях:

- температуру колонки программируют: 80 °С в течение 2 мин, повышение температуры со скоростью 30 °С/мин до 150 °С, при температуре 150 °С выдерживают в течение 5 мин;

- температура детектора и блока ввода проб – 200 °С;

- скорость газа-носителя (азот) 20 мл/мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент разделения пиков дихлорметана и спирта этилового, рассчитанный из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы, должен быть не менее 1.5;

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика дихлорметана, не должно превышать 10 %;

- относительное время удерживания пика спирта этилового по отношению к пику дихлорметана должно быть около 0.8.

По 1 мл газовой фазы испытуемого раствора и раствора сравнения 2 попеременно хроматографируют, получая не менее 5 хроматограмм в указанных выше условиях.

Содержание дихлорметана (X), в ppm, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 * 5 * 20}{S_0 - S_1},$$

где:

$S_1$  - среднее значение площади пика дихлорметана, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_0$  - среднее значение площади пика дихлорметана, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения 2.

Содержание дихлорметана в таблетках, покрытых оболочкой, должно выдерживать требования, указанные в Табл. 2 статьи 5.4.

<sup>1</sup> При разработке методик использованы материалы Фармакопеи США (24 изд.) с разрешения Фармакопейной Конвенции США, Инк. © Copyright 2000. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.

## О проектах общих статей ГФУ

### 2.4.24. Идентификация и контроль остаточных растворителей и

#### 5.4. Остаточные растворители

Гризодуб А.И

доктор хим. наук, профессор, зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе

Представленные проекты общих статей ГФУ разработаны для включения в Дополнение к ГФУ (выпуск предполагается в 2002 году) взамен общей статьи ГФУ 5.4. «Остаточные количества органических растворителей» [1], которая, в свою очередь, базируется на ГОФС 42-1-97 «Остаточные количества органических растворителей». Необходимость такой разработки связана с гармонизацией с Европейской Фармакопеей (ЕФ) [2], требования которой, с одной стороны, в некоторых случаях более жесткие (например, для бензола), а с другой стороны, для малотоксичных растворителей — существенно либеральнее. Кроме того, действующая общая статья 5.4 ГФУ (и, соответственно, ГОФС 42-1-97) регламентирует содержание 25 остаточных растворителей (ОР), в то время как представленный проект общей статьи 5.4 Дополнения к ГФУ регламентирует содержание 61 ОР и описывает (без нормирования) еще 10 ОР. Фактически, делается попытка охватить все ОР, используемые в производстве лекарственных средств.

Представленные проекты общих статей 2.4.24 и 5.4 могли быть включены еще в ГФУ 1-го изд., однако статья 5.4 ЕФ [2] устанавливает очень жесткие требования к содержанию растворителей класса 1, которые мало оправданы с точки зрения токсичности и нередко не выполнимы для отечественных производителей. Поэтому было решено отложить введение статей 2.4.24 и 5.4 ЕФ до принятия Дополнения к ГФУ, когда накопятся данные об опыте применения этих требований в других странах.

Относительно термина «остаточные растворители». В действующей общей статье 5.4 ГФУ используется термин «остаточные количества органических растворителей». Однако в оригинальном тексте ЕФ широко применяется понятие «остаточный растворитель» класса 1, 2, 3. Поэтому было решено ввести этот термин в текст проекта статьи и, соответственно, изменить название проекта статьи.

Построение проектов общих статей 2.4.24 и 5.4 отличается от структуры действующей общей статьи 5.4 ГФУ. Проект статьи 2.4.24 «Идентификация и контроль остаточных растворителей» представляет собой методическую часть проекта общей статьи 5.4. «Остаточные растворители»: в проекте статьи 2.4.24 приведены методики идентификации и контроля остаточных растворителей, регламентация содержания которых дана в проекте статьи 5.4. В статье 5.4 ГФУ регламентирующая и методическая часть совмещены, что вызывало трудности при ссылаках в монографиях ГФУ, являющихся переводом ЕФ.

Проекты статей 2.4.24 и 5.4 включают европейскую часть (являющуюся переводом соответствующих статей 2.4.24 и 5.4 ЕФ) и национальную часть, учитывающую отечественный опыт и специфику.

#### *Особенности проекта общей статьи 2.4.24 «Идентификация и контроль остаточных растворителей»*

Проект общей статьи 2.4.24, как уже было отмечено выше, является методической частью проекта общей статьи 5.4. Приведенные в проекте статьи 2.4.24 методики позволяют идентифицировать и количественно определить все ОР классов 1 и 2, описанные в проекте статьи 5.4. Поскольку можно использовать и более простые методики анализа ОР для конкретных лекарственных средств, в национальной части приведено соответствующее замечание.

Главным достоинством проекта общей статьи 2.4.24 является единый подход, позволяющий идентифицировать и количественно определить все растворители, описанные в проекте общей статьи 5.4. В европейской части приведена общая схема анализа при идентификации и проведении испытания на предельное содержание остаточных растворителей в лекарственных средствах.

Важным является вопрос необходимой точности представленных методик анализа. Об этом в проекте статьи 2.4.24 не говорится, что и понятно — для каждого конкретно-

го растворителя (из 67) требования могут быть разными. В проекте статьи 5.4 в разделе 3.4 указано, что данные методики должны быть валидированы в соответствии с руководством ИСН "Валидация аналитических методик" и Дополнением к этому документу. Поэтому предполагается валидация методики определения ОР в каждом конкретном случае, что и отмечено во вступительной части проекта общей статьи 2.4.24: «Когда описанную ниже методику испытаний применяют для количественного определения остаточных растворителей в конкретном веществе, она должна быть валидирована».

Таким образом, описанные в проекте статьи 2.4.24 методики не имеют прямого действия: для каждого конкретного лекарственного средства требуется проведение валидации.

Методики, описанные в проекте статьи 2.4.24, достаточно сложны. Для конкретного лекарственного средства или вспомогательного вещества могут быть предложены более простые методики. Поскольку в любом случае необходимо проводить валидацию, в национальную часть проекта статьи 2.4.24 внесено упоминание о возможности использования любых других валидированных методик.

Из общей статьи 5.4 ГФУ в национальную часть проекта общей статьи 2.4.24 перенесена только методика определения хлористого метилена в таблетках, покрытых оболочкой (из USP 24), поскольку данная методика не описана в ЕФ. Приведение остальных методик, в принципе, излишне, поскольку методики, описанные в ЕФ, носят общий характер.

#### *Особенности проекта общей статьи ГФУ 5.4. «Остаточные растворители»*

Проект общей статьи 5.4 «Остаточные растворители» неразрывно связан с проектом общей статьей 2.4.24. «Идентификация и контроль остаточных растворителей». Кроме классификации и нормирования содержания ОР, проект статьи 5.4 включает также большое количество информационного материала по токсикологическим аспектам проблемы.

Европейская часть проекта общей статьи 5.4 является переводом соответствующей общей статьи 5.4 ЕФ 4-го издания [2]. Для удобства пользования в проекте общей статьи все ОР в пределах класса даны в порядке русского алфавита, поэтому их расположение отличается от ЕФ, где они приводятся в порядке английского алфавита. ОР даны под теми же

названиями, под которыми они описаны в ЕФ.

Основные положения проекта общей статьи 5.4 можно сформулировать следующим образом:

1. Все растворители разбиваются на классы токсичности — классы 1, 2, 3 и растворители, для которых необходимые данные по токсичности отсутствуют.

2. *Растворители класса 1.* Их применения следует избегать в производстве субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств (ГЛС). Для них, независимо от дозировки лекарственного средства, регламентируется предел концентрации (в ppm). Это означает, например, что для клофелина с дозировкой в таблетках 0.1 мг и для анальгина с дозировкой в таблетках 500 мг предельная концентрация остаточного бензола в субстанциях одинакова — 2 ppm. Таким образом, регламентация содержания растворителей класса 1 в субстанциях не связана с их токсичностью в лекарственных средствах и является административным актом, имеющим целью запретить использование этих растворителей в производстве. Учитывая, что подавляющая часть субстанций ввозится в Украину из-за рубежа, данная проблема не является актуальной для нашей страны, но осложняет закупку субстанций за рубежом. Это является одной из причин, по которой статья 5.4 ЕФ не была введена в ГФУ 1-го изд.

3. *Растворители класса 2.* В отличие от растворителей класса 1, регламентация содержания растворителей класса 2 прямо связана с их максимальным суточным потреблением в ГЛС, что является несомненным достоинством проекта статьи 5.4. Предлагается два способа регламентации растворителей класса 2 — по предельной концентрации (полагая, что максимальная суточная доза лекарственного средства составляет 10 г) и исходя из разрешенного суточного воздействия (PDE) — максимально допустимого потребления в сутки остаточного растворителя в лекарственных средствах.

4. *Растворители класса 3.* Их содержание в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах на уровне ниже 0.5% или 50 мг/сутки не требует обоснования. Возможны и более высокие концентрации, но с обоснованием. Отметим, что к этому классу относятся такие известные растворители как ацетон, этилацетат, бутанол, диметилсульфоксид и т.д.

Таблица

## Сравнение требований статьи 5.4 ГФУ и проекта общей статьи 5.4

№	Названиерастворителя	Проект общей статьи 5.4		Статья 5.4 ГФУ	коэффициент ужесточения требований
		PDE (мг/сутки)	предел концентрации (ppm)	предел концентрации (ppm) (пересчет из %)	
1.	Этиленоксид	-	-	10	-
2.	Бензол	-	2	100	50
3.	Четыреххлористый углерод	-	4	10	2.5
4.	1,2-Дихлорэтан	-	5	100	20
5.	1,1-Дихлорэтен	-	8	-	-
6.	1,1,1-Трихлорэтан	-	1500	-	-
7.	Ацетонитрил	4.1	410	100	0.24
8.	Гексан	2.9	290	2000	6.9
9.	N,N-Диметилацетамид	10.9	1090	-	-
10.	N,N-Диметилформамид	8.8	880	1000	1.1
11.	1,2-Диметоксиэтан	1.0	100	-	-
12.	1,4-Диоксан	3.8	380	100	0.26
13.	Дихлорметан	6.0	600	500	0.83
14.	1,2-Дихлорэтен	18.7	1870	-	-
15.	Ксилол*	21.7	2170	-	-
16.	Метанол	30.0	3000	1000	0.33
17.	Метилбутилкетон	0.5	50	-	-
18.	2-Метилпиридин	-	-	500	-
19.	N-Метилпириролидон	48.4	4840	-	-
20.	Метилциклогексан	11.8	1180	-	-
21.	2-Метоксизтанол	0.5	50	1000	20
22.	Нитрометан	0.5	50	-	-
23.	Пиридин	2.0	200	500	2.5
24.	Сульфолан	1.6	160	-	-
25.	Тетралин	1.0	100	-	-
26.	Толуол	8.9	890	1000	-
27.	1,1,2-Трихлорэтен	0.8	80	100	-
28.	Формамид	2.2	220	1000	-
29.	Хлорбензол	3.6	360	-	-
30.	Хлороформ	0.6	60	50	-
31.	Циклогексан	38.8	3880	-	-
32.	Этиленгликоль	6.2	620	-	-
33.	2-Этоксизтанол	1.6	160	-	-
34.	Анизол	-	5000	-	-
35.	Ацетон	-	5000	1000	0.2
36.	1-Бутанол	-	5000	500	0.1
37.	2-Бутанол	-	5000	-	-
38.	Бутилацетат	-	5000	-	-
39.	Гептан	-	5000	2000	0.4
40.	Диметилсульфоксид	-	5000	-	-
41.	Изобутилацетат	-	5000	-	-
42.	Изопропилацетат	-	5000	-	-
43.	Кумол	-	5000	-	-
44.	Метилацетат	-	5000	-	-
45.	3-Метил-1-бутанол	-	5000	-	-
46.	Метиловый эфир	-	5000	-	-
47.	Метилизобутилкетон	-	5000	-	-
48.	2-Метил-1-пропанол	-	5000	500	0.1
49.	Метилэтилкетон	-	5000	-	-

Таблица (продолжение)

Сравнение требований статьи 5.4 ГФУ и проекта общей статьи 5.4

50.	Муравьиная кислота	-	5000	-	-
51.	Пентан	-	5000	2000	0.4
52.	1-Пентанол	-	5000	-	-
53.	1-Пропанол	-	5000	-	-
54.	2-Пропанол	-	5000	5000	1.0
55.	Пропилацетат	-	5000	-	-
56.	Тetraгидрофуран	-	5000	-	-
57.	Уксусная кислота	-	5000	1000	0.2
58.	Этанол	-	5000	10000	2
59.	Этилацетат	-	5000	1000	0.2
60.	Этиловый эфир	-	5000	1000	0.2
61.	Этилформиат	-	5000	-	-
62.	1,1-Диметоксиметан	?	?	-	-
63.	2,2-Диметоксипропан	?	?	-	-
64.	1,1-Дизтоксипропан	?	?	-	-
65.	Изопропиловый эфир	?	?	-	-
66.	Изооктан	?	?	-	-
67.	Метилизопропилкетон	?	?	-	-
68.	Метилтетрагидрофуран	?	?	-	-
69.	Петролейный эфир	?	?	-	-
70.	Трихлоруксусная кислота	?	?	-	-
71.	Трифторуксусная кислота	?	?	-	-

5. Растворители, для которых необходимые данные по токсичности отсутствуют. Для таких растворителей заявители должны обосновывать пределы сами.

Сравнение требований действующей статьи 5.4 ГФУ и проекта общей статьи 5.4 представлено в таблице.

В ЕФ не приведено нормирование содержания остаточного этиленоксида (хотя есть общая статья 2.4.25 «Определение этиленоксида и диоксана») и 2-метилпиридина, которое дано в общей статье 5.4 ГФУ. Поэтому в национальную часть проекта общей статьи 5.4 внесена регламентация содержания этих растворителей в соответствии с требованиями общей статьи 5.4 ГФУ. Эти требования также отражены в таблице.

Как видно из таблицы, основные отличия проекта общей статьи 5.4 от действующей статьи 5.4 ГФУ следующие:

1. Требования к содержанию остаточного бензола ужесточаются в 50 раз.
2. Требования к содержанию остаточного 1,2-дихлорэтана и 2-метоксиэтанола (метилцелозольва) ужесточаются в 20 раз.
3. Требования к содержанию остаточного четыреххлористого углерода и пиридина ужесточаются в 2.5 раза.
4. Требования к содержанию остаточного гексана ужесточаются в 6.9 раза.

5. Требования к содержанию этанола ужесточаются в 2 раза.

6. Требования к содержанию большой группы остаточных растворителей (ацетона, этилацетата, этилового эфира и т.д.) снижаются в 5-10 раз.

Пределы концентраций ОР класса 2, приведенные в проекте общей статьи 5.4, установлены для суточной дозы ГЛС, не превышающей 10 г. Поскольку для инфузионных препаратов суточная доза значительно выше, для них необходимо показать, что суточное воздействие ОР не превышает PDE, приведенного в Табл. 2 проекта статьи 5.4. Подобная ситуация характерна и для некоторых других ГЛС (например, сорбента «Сорбогель»). Соответствующее замечание сделано в национальной части проекта статьи 5.4.

Для установления пределов содержания остаточных растворителей в проекте общей статьи 5.4 предложены два подхода. Основным является подход 1, основанный на нормировании пределов концентрации ОР в исследуемом веществе. Предложен и подход 2, основанный на регламентации суммарного количества ОР в готовом лекарственном средстве. Подход 2, несмотря на свою привлекательность, вряд ли применим в условиях Украины, поскольку предполагает отсутствие нормирования содержания ОР в субстанции. Данный подход может стать основанием для

установления более высоких пределов содержания ОР в субстанции, используемой для производства конкретного ГЛС. Учитывая вышеизложенное, в национальной части дано соответствующее разъяснение.

#### *Нормирование содержания ОР при малых дозировках субстанции в ГЛС*

Важным является случай, когда субстанция содержится в ГЛС в малых дозировках (менее 10 мг/ единицу ГЛС). Данный вопрос освещен в национальной части проекта общей статьи 5.4.

Очевидно, что для таблетки массой, например, 100 мг и более вклад субстанции с дозировкой менее 10 мг в общую загрязненность ОР готового лекарственного средства незначим. Поэтому предел концентрации ОР класса 2 в таких субстанциях может быть увеличен в К раз, где К — коэффициент увеличения концентрации. Данный вопрос был подробно рассмотрен нами ранее на основе принципа незначимости [3] и предложен обоснованный расчет для этого коэффициента, приведенный в проекте общей статьи 5.4. При этом учитываются и требования ЕФ, где указано, что содержание ОР не должно (без дополнительного обоснования) превышать 0.5 %. Данный подход позволяет регламентировать содержание ОР в субстанции без учета конкретного состава ГЛС. Фактически, использование коэффициента увеличения концентрации является альтернативой подходу 2, который мало применим в условиях Украины.

#### *Регламентация ОР классов 1 и 2 при их совместном присутствии*

Наиболее сложным является нормирование содержания ОР в случае их совместного

присутствия. Например, в субстанции присутствуют нитрометан и хлороформ в концентрациях, соответственно, 50 ppm и 60 ppm, каждый ОР соответствует требованиям, приведенным в Табл. 2 проекта общей статьи 5.4. Однако это означает, что пациент получает токсическую дозу, в 2 раза большую, чем при наличии только нитрометана или только хлороформа, поскольку токсичности, как минимум, складываются. Данный вопрос был рассмотрен нами ранее [3] и предложено соответствующее решение — сумма концентраций всех ОР в долях от их предельной концентрации не должна превышать 1, что и отражено в национальной части проекта общей статьи 5.4. Подобный подход уже был применен при разработке ВФС 42У-3/37-850-98 «Гранулы (пеллеты) омепразола».

Такой подход предложен для регламентации только ОР класса 2. В принципе, его можно было бы применять и для ОР класса 1, но, как уже было сказано выше, нормирование содержания этих растворителей является административным актом, не связанным с их реальной токсичностью и дозировкой субстанции в ГЛС. Поэтому применение описанного подхода к ОР класса 1 нецелесообразно.

Нецелесообразно его применение и к ОР класса 3, учитывая их низкую токсичность.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
2. European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. - Strasbourg, 2001. - 2416 p.
3. Гризодуб А.И., Зинченко А.А., Левин М.Г., Георгиевский В.П. Влияние качественного состава остаточных количеств органических растворителей и дозировки действующего вещества на регламентацию содержания этих растворителей в лекарственных средствах // Фармаком. — 1998. - № 5. — С. 17-22.

Вашему вниманию предлагаются проекты монографий «Продукты ферментации» и «Макрогены», которые планируется включить в Дополнение к Государственной Фармакопее Украины (ГФУ) 1-го изд.

Исходные варианты проектов были представлены в отдел ГФУ ответственным исполнителем по отделу ГФУ – ст. науч. сотр., канд. биол. наук Товмсян Е.К совместно с членами Редколлегии ГФУ доктором фарм. наук., проф. Ю.М. Краснопольским (вице-президентом ЗАО «Биолек» по научной работе и контролю качества) и канд. хим. наук С.В.Суром (зам. Главного государственного инспектора Украины по контролю качества лекарственных средств), соответственно.

Проекты рецензировали члены Редколлегии ГФУ канд. фарм. наук Воробьев Н.Е. и канд. биол. наук Кобзарь А.И.; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Украины Луйк А.И. и канд. фарм. наук Герасимчук Т.В, соответственно.

Ваши замечания и предложения к проектам монографий просим направлять в адрес ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (отдел ГФУ) или журнала «Фармаком». Приглашаем всех заинтересованных лиц к открытому обсуждению на Форуме сайта журнала «Фармаком» [Farmacomua.narod.ru](http://Farmacomua.narod.ru).

## ПРОЕКТ

### **ПРОДУКТИ ФЕРМЕНТАЦІЇ**

Вимоги даної статті поширюються на непрямі генні продукти, одержувані ферментацією. Вимоги даної статті не поширюються на:

- монографії Фармакопеї, що стосуються вакцин для людини або для ветеринарії;
- продукти, одержувані з безперервних клітинних ліній людського або тваринного походження;
- прямі генні продукти, одержувані шляхом транскрипції і трансляції від нуклеїнової кислоти до білка, що піддається або не піддається посттрансляційній модифікації;
- продукти, одержувані з продукту ферментації за допомогою напівсинтезу або методом біокаталітичної трансформації;
- цільні бульйонні концентрати або сировина для ферментації.

У даній статті наведені загальні вимоги до виробництва і виділення продуктів ферментації. Положення даної статті не обов'язково всеосяжні і в певних випадках можуть бути доповнені в окремих статтях і вимогах компетентних уповноважених органів.

### **ВИЗНАЧЕННЯ**

У даній статті під продуктами ферментації розуміють активні або неактивні фармацевтичні речовини, одержані як непрямі генні продукти в результаті контрольованого процесу ферментації. Це первинні або вторинні метаболіти немодифікованих або модифікованих традиційними способами або методом рекомбінантних ДНК (rDNA) мікроорганізмів, таких як бактерії, дріжджі, гриби та мікроводорості. До таких метаболітів належать вітаміни, антибіотики, амінокислоти, алкалоїди та полісахариди.

Вони можуть бути одержані порціями або методом безперервної ферментації з подальшими стадіями екстракції, концентрації, очищення і виділення.

### **ВИРОБНИЦТВО**

Процес виробництва має бути валідований. Обсяг валідаційних досліджень залежить від ступеня критичності конкретної технологічної стадії.

### **ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООРГАНІЗМУ-ПРОДУЦЕНТА**

Історія використовуваного для виробництва мікроорганізму має бути підтверджена документально. Мікроорганізм має бути адекватно описаний. До опису може бути включене визначення фенотипу мікроорганізму, мікро- і макроскопічні методи, біохімічні тести і, якщо доцільно, визначення генотипу мікроорганізму і молекулярно-генетичні тести.

### **ПРОЦЕСИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬ СИСТЕМУ ВІСІВНИХ СЕРІЙ**

*Головний банк клітин* - це гомогенна суспензія або ліофілізат вихідних клітин, розфасовані в окремі контейнери для зберігання. Треба підтвердити життєздатність і продуктивність клітин при зберіганні за обраних умов, а також їхню здатність після зберігання ініціювати потрібний виробничий процес. Розмноження головного банку клітин може здійснюватися шляхом пересівань із використанням робочого банку клітин.

*Робочий банк клітин* - це гомогенна суспензія або ліофілізат клітинного матеріалу, одержаного з головного банку клітин, розфасовані рівними об'ємами в окремі контейнери

для зберігання (наприклад, у рідкому азоті).

Процес виробництва може здійснюватися порціями або методом безперервного культивування і може бути припинений за певних умов.

Усі контейнери банку клітин зберігають в однакових умовах. Витягнуті зі сховища ампули, пробірки або носії з культурою повернення до банку клітин не підлягають.

#### ПРОЦЕСИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬ ФАЗОВИЙ РІСТ У КУЛЬТУРАХ

Для приготування інокуляту в підходящому живильному середовищі використовують вміст контейнера робочого банку клітин, який, якщо необхідно, ресуспендують. Після підходячого періоду росту одержану культуру використовують для ініціювання процесу ферментації, якому, якщо необхідно, передують попереднє культивування у передферментаційному апараті. На кожній фазі процесу культивування мають бути визначені використовувані умови, які мають бути дотримані в кожному виробничім циклі.

#### КОНТРОЛЬ ЗМІН

Якщо внесення змін у виробничий процес призводить до змін у профілі домішок продукту, критичні стадії виробничого процесу мають бути валідовані повторно.

Якщо мікроорганізм, використовуваний у процесі виробництва, піддається змінам, що викликають зміни в профілі домішок продукту, критичні стадії виробничого процесу, пов'язані з такими змінами, особливо стадії очищення і виділення, мають бути валідовані повторно.

Повторна валідація має показати, що нові домішки, які з'явилися у продукті в результаті змін, адекватно контролюються проведеними випробуваннями. Якщо необхідно, треба увести додаткові або альтернативні випробування, установити відповідні межі. Якщо зміна виробничого процесу або мікроорганізму призводить до збільшення вмісту вже контрольованої домішки, треба обґрунтувати прийнятність такого збільшення.

При заміні головного банку клітин повторну валідацію критичних стадій виробничого процесу треба проводити таким чином, щоб довести, що при цьому не відбулося погіршення показників якості і безпеки продукту. При уведенні у виробничий процес модифікованого або нового мікроорганізму особливу увагу треба приділяти можливим змінам профілю домішок у продукті.

#### СИРОВИНА

Якість сировини, використовуваної для процесів ферментації і/або на наступних стадіях обробки, має відповідати її призначенню. Сировину треба випробовувати на відповідність заявленим показникам якості.

Рівень біозабруднень середовища або повітря, що надходить для аерації, має бути досить низьким для гарантії того, що можливе мікробіологічне забруднення не буде негативно впливати на якість, чистоту і безпеку продукту. Додавання у процесі ферментації таких компонентів, як живильні речовини, прекуратори або субстрати треба проводити з дотриманням правил асептики.

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА

Завданням контролю в процесі виробництва є доказ стабільності умов у процесі ферментації та на наступних стадіях обробки, а також стабільності показників якості виділеного продукту. Особливу увагу слід приділяти забезпеченню того, щоб будь-яке забруднення мікроорганізмами, яке негативно впливає на якість, чистоту і безпеку продукту, могло бути виявлене застосовуваними методами контролю.

Умови виробництва контролюють відповідними методами, підходящими, наприклад, для контролю:

- температури,
- рН,
- швидкості аерації,
- швидкості перемішування,
- тиску, а також визначення концентрації одержуваного продукту.

#### НАСТУПНІ СТАДІЇ ОБРОБКИ

По закінченні процесу ферментації мікроорганізм-продуцент інактивують або видаляють. Подальші операції призначені для зниження залишкових кількостей живильного середовища до припустимого рівня і забезпечення стабільності показників якості одержуваного продукту.

Має бути показано, що використовувані процеси очищення (наприклад, обробка із застосуванням деревного вугілля, ультра-фільтрація, екстракція розчинниками) зводять до мінімуму або видаляють:

- залишки мікроорганізмів-продуцентів, живильних середовищ, субстратів і прекураторів;
- небажані продукти трансформації субстратів і прекураторів.

Якщо необхідно, проводять відповідні випробування продукту ферментації у процесі ви-

робництва або після його виділення.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ, ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Вимоги, які має задовольняти продукт протягом терміну придатності, а також конкретні методи випробування мають бути описані у

відповідних окремих статтях.

ЗБЕРІГАННЯ

Як зазначено в окремій статті.

МАРКУВАННЯ

Як зазначено в окремій статті.

МАКРОГОЛИ

Macrogola

MACROGOLS

Макроголи являють собою суміш полімерів із загальною формулою  $H-(OCH_2-CH_2)_n-OH$ , середня відносна молекулярна маса яких відповідає зазначеному номінальному числу (n). Можливі добавки відповідного стабілізатора.

ВЛАСТИВОСТІ

Тип макроголу	Опис	Розчинність
300	прозора, в'язка,	змішується з водою P,
400	безбарвна або майже безбарвна,	дуже легко розчинний в ацетоні P, 96 % спирті P і метиленхлориді P,
600	гігроскопічна рідина	практично не розчинний у жирних і мінеральних оліях
1000	біла або майже біла, гігроскопічна, воскоподібна або парафіноподібна маса	дуже легко розчинний у воді P, легко розчинний у 96 % спирті P і метиленхлориді P, практично не розчинний у жирних і мінеральних оліях
1500	біла або майже біла, воскоподібна або парафіноподібна маса	дуже легко розчинний у воді P і метиленхлориді P, легко розчинний у 96 % спирті P, практично не розчинний у жирних і мінеральних оліях
3000	біла або майже біла, воскоподібна або парафіноподібна маса	дуже легко розчинний у воді P і метиленхлориді P, дуже мало розчинний у 96 % спирті P, практично не розчинний у жирних і мінеральних оліях
3350		
4000	біла або майже біла, воскоподібна або парафіноподібна маса	дуже легко розчинний у воді P і метиленхлориді P, практично не розчинний у 96 % спирті P, жирних і мінеральних оліях
6000		
8000		
20 000	біла або майже біла, воскоподібна або парафіноподібна маса	дуже легко розчинний у воді P, розчинний у метиленхлориді P, практично не розчинний у 96 % спирті P, жирних і мінеральних оліях
35 000		

ПРОЕКТ

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Субстанція має відповідати вимогам щодо в'язкості, зазначеним у розділі «Випробування на чистоту».

**B.** 1 г субстанції поміщають у пробірку, додають 0.5 мл кислоти сірчаної P, закривають пробірку притертою пробкою, спорядженою зігнутою відвідною трубкою, і нагрівають до припинення виділення білих парів. Пари збирають, пропускаючи їх через відвідну трубку, занурену в 1 мл розчину ртуті(II) хлориду P; утворюється рясний білий кристалічний осад.

**C.** До 0.1 г субстанції додають 0.1 г калію тіоціанату P і 0.1 г кобальту нітрату P, ретельно перемішують скляною паличкою. До одержаної суміші додають 5 мл метиленхлориду P і струшують; рідка фаза забарвлюється в синій колір.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 12.5 г субстанції розчиняють у воді P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Забарвлення розчину, приготованого для випробування "Прозорість розчину", має бути не інтенсивнішим за еталон BY<sub>6</sub>.

**Кислотність або лужність.** 5.0 г субстанції розчиняють у 50 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, P, додають 0.15 мл розчину бромтимолового синього P1; з'являється жовте або зелене забарвлення, яке переходить у сине при додаванні не більше 0.1 мл 0.1 M розчину натрію гідроксиду.

**В'язкість (2.2.9).** Значення в'язкості має відповідати значенням, наведеним у Табл. 1444.-1. При розрахунках використовують відповідні значення густини, наведені в тій же таблиці.

Таблиця 1444.-1

Тип макроголу	Кінематична в'язкість (мм <sup>2</sup> ·с <sup>-1</sup> )	Динамічна в'язкість (мПа·с)	Густина* (г/мл)
300	71 - 94	80 - 105	1.120
400	94 - 116	105 - 130	1.120
600	13.9-18.5	15 - 20	1.080
1000	20.4-27.7	22 - 30	1.080
1500	31 - 46	34 - 50	1.080
3000	69 - 93	75 - 100	1.080
3350	76 - 110	83 - 120	1.080
4000	102- 158	110 - 170	1.080
6000	185 - 250	200 - 270	1.080
8000	240 - 472	260 - 510	1.080
20 000	2500 -3200	2700 - 3500	1.080
35 000	10 000 - 13 000	11 000 - 14 000	1.080

Для макроголів із відносною молекулярною масою, що перевищує 400, визначення в'язкості проводять, використовуючи розчин 50 % (м/м) субстанції.

\*Густина макроголів 300 і 400. Густина розчинів 50 % (м/м) субстанції для інших макроголів.

**Температура тверднення (2.2.18).** Значення температури тверднення має відповідати значенням, наведеним у Табл. 1444.-2.

Таблиця 1444.-2

Тип макроголу	Температура тверднення (°С)
600	15 - 25
1000	35 - 40
1500	42 - 48
3000	50 - 56
3350	53 - 57
4000	53 - 59
6000	55 - 61
8000	55 - 62
20 000	не менше 57
35 000	не менше 57

**Гідроксильне число.** Значення гідроксильного числа має відповідати значенням, наведеним у Табл. 1444.-3. Зазначену в таблиці наважку субстанції поміщають у суху конічну колбу, сполучену зі зворотним холодильником, додають 25.0 мл розчину фталевого ангідриду *P* і перемішують рідину обертальними рухами до повного розчинення субстанції. Колбу поміщають на гарячу плитку, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 60 хв і охолоджують. Холодильник промивають 25 мл піридину *P*, потім 25 мл води *P*. До одержаного розчину додають 1.5 мл розчину фенолфталеїну *P* і титрують 1 М розчином натрію гідроксиду до появи слабко-рожевого забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід.

Гідроксильне число обчислюють за формулою:

$$\frac{56.1 \times (n_2 - n_1)}{m}$$

де:

$n_1$  — об'єм 1 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування випробовуваного розчину, у мілілітрах;

$n_2$  — об'єм 1 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування контрольного дослід, у мілілітрах;

$m$  — маса наважки субстанції, у грамах.

Таблиця 1444.-3

Тип макроголу	Гідроксильне число	m (г)
300	340 - 394	1.5
400	264 - 300	1.9
600	178 - 197	3.5
1000	107 - 118	5.0
1500	70 - 80	7.0
3000	34 - 42	12.0
3350	30 - 38	12.0
4000	25 - 32	14.0
6000	16 - 22	18.0
8000	12 - 16	24.0
20 000	-	-
35 000	-	-

Для макроголів із відносною молекулярною масою більше 1000, якщо вміст води перевищує 0.5 %, відповідну наважку субстанції попередньо сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 2 год і потім проводять визначення.

**Відновлюючі речовини.** 1 г субстанції розчиняють в 1 мл розчину 10 г/л резорцину *P*, якщо необхідно обережно нагріваючи. До одержаного розчину додають 2 мл кислоти хлористоводневої *P*; через 5 хв забарвлення одержаного розчину має бути не інтенсивнішим за еталон  $R_3$  (2.2.2, метод I).

**Формальдегід.** Не більше 0.0015 % (15 ppm).

**Випробовуваний розчин.** До 1.00 г субстанції додають 0.25 мл розчину хромотропової кислоти натрієвої солі *P*, охолоджують у льодяній бані і додають 5.0 мл кислоти сірчаної *P*. Одержаний розчин витримують протягом 15 хв і повільно доводять водою *P* до об'єму 10 мл.

**Розчин порівняння.** 0.430 г розчину формальдегіду *P* доводять водою *P* до об'єму 100 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою *P*

до об'єму 100 мл. 1.00 мл одержаного розчину поміщають у колбу місткістю 10 мл, змішують із 0.25 мл розчину хромотропової кислоти натрієвої солі *P*, охолоджують у льодяній бані і додають 5.0 мл кислоти сірчаної *P*. Одержаний розчин витримують протягом 15 хв і повільно доводять водою *P* до об'єму 10 мл.

**Холостий розчин.** 1.00 мл води *P* поміщають у колбу місткістю 10 мл, змішують із 0.25 мл розчину хромотропової кислоти натрієвої солі *P*, охолоджують у льодяній бані і додають 5.0 мл кислоти сірчаної *P*. Одержаний розчин повільно доводять водою *P* до об'єму 10 мл.

Оптична густина (2.2.25) випробовуваного розчину, виміряна по відношенню до холостого розчину за довжини хвилі 567 нм, не має перевищувати оптичну густина розчину порівняння.

**Етиленгліколь і діетиленгліколь.** Визначення проводять для макрогोलів із відносною молекулярною масою менше 1000.

Не більше 0.4 % (м/м) суми етиленгліколю і діетиленгліколю. Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28).

**Випробовуваний розчин.** 5.00 г субстанції розчиняють в ацетоні *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчин порівняння.** 0.10 г етиленгліколю *P* і 0.50 г діетиленгліколю *P* розчиняють в ацетоні *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять ацетоном *P* до об'єму 10.0 мл.

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

- колонка скляна розміром 1.8 м х 2 мм, заповнена гіатомітом силанізованим для газової хроматографії *P* із нанесеним 5 % (м/м) макроголом 20 000 *P*;
- газ-носій азот для хроматографії *P*;
- швидкість газу носія 30 мл/хв;
- температура блока вводу проб і детектора 250 °С.

Якщо необхідно, колонку передкондиціонують нагріванням при температурі 200 °С протягом близько 15 год. Установлюють початко-

ву температуру колонки таким чином, щоб час утримування піка діетиленгліколю становив від 14 хв до 16 хв.

Поперемінно хроматографують 2 мкл випробовуваного розчину і 2 мкл розчину порівняння, підвищуючи температуру колонки на близько 30 °С зі швидкістю 2 °С/хв, але не більше 170 °С. Одержують по п'ять хроматограм для кожного розчину для перевірки збіжності відгуку.

**Етиленоксид і діоксан (2.4.25).** Не більше 0.0001 % (1 ppm) етиленоксида і 0.001 % (10 ppm) діоксану.

**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.002 % (20 ppm). 2.0 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл. 12 мл одержаного розчину витримують випробовування на важкі метали. Еталон готують із використанням еталонного розчину свинцю (2 ppm Pb) *P*.

**Вода (2.5.12).** Не більше 2.0 % для субстанції з відносною молекулярною масою, що не перевищує 1000, і не більше 1.0 % для субстанцій із відносною молекулярною масою, що перевищує 1000. Визначення проводять із 2.00 г субстанції.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.2 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

#### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- тип макроголу;
- назву і вміст доданого стабілізатора.

**N**

### ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЬ

*Polyethylenglycolum*

### ПОЛІЕТИЛЕНОКСИД

*Polyethylenoxidum*

#### ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у сухому, прохолодному місці. Краще використовувати контейнер з алюмінію, скла, неіржавіючої сталі.

## Проблеми. Пошук. Рішення.

УДК 615.37:615.11

Сельникова О.П., Думанский В.Д., Моисеева А.В.,  
Георгиевский В.П., Пиотровская А.Г., Крупа Н.А.  
ГП «Центр иммунобиологических препаратов»  
ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

### Иммунобиологические (биологические) препараты в национальных и межнациональных Фармакопеях

В статье приведен сравнительный анализ и обобщение сложившегося наследия представления иммунобиологических (биологических) препаратов в Фармакопеях бывшего СССР, а также в Европейской Фармакопее, Британской Фармакопее и Фармакопее США того же периода. Обзор может быть использован при разработке концепции представления иммунобиологических (биологических) препаратов в Государственной Фармакопее Украины.

Принятый в Украине термин "иммунобиологические препараты" несколько отличен от принятого в мире - "биологические препараты", хотя и охватывает группы препаратов, аналогичные тем, которые определены Европейским Союзом (ЕС) и Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ).

Так, принятое в СССР и действующее до настоящего времени определение включает следующий перечень основных групп медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП): вакцины, анатоксины, лечебно-профилактические сыворотки, иммуноглобулины и другие препараты из сыворотки крови человека и животных, предназначенные для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, ферментные препараты микробного происхождения, бактериофаги, аллергены, диагностикумы и антигены, сыворотки, антитела и иммуноглобулины диагностические, тест-системы иммуноферментные, среды питательные бактериологические и диагностические [1].

Согласно определению ЕС, биологические препараты, в основном, классифицируют по методам производства. Сюда входят лекарственные средства, изготовленные следующими способами:

- a) культивированием микроорганизмов, за исключением полученных по технологии рекомбинантной ДНК (r-ДНК);
- b) культивированием микроорганизмов и клеток, включая полученные по технологии рекомбинантной ДНК или гибридной технологии;
- c) экстракцией из биологических тканей;
- d) репродукцией живых агентов в эмбрионах или животных.

Биологические препараты, получаемые с помощью этих методов, включают: вакцины, иммунные сыворотки, антигены, гормоны, цитокины, энзимы и другие продукты ферментации (включая моноклональные антитела и продукцию, полученную на основании рекомбинантной ДНК) [2].

По определению ВОЗ процедуры регламентации, необходимые для контроля биологических препаратов, большей частью определяются источниками этих препаратов и способами их производства. Практика производства в сфере действия данных принципов включает:

- выращивание штаммов микроорганизмов и клеток эукариот;
- экстракцию веществ из биологических тканей, включая ткани организма человека и животных и растительные ткани (аллергены);
- технологию рекомбинантной ДНК;
- гибридную технологию;
- посев микроорганизмов в эмбрионы или организм животного.

Биологические препараты, производимые такими способами, включают аллергены, антигены, вакцины, гормоны, цитокины, ферменты, цельную человеческую кровь и препараты, получаемые из человеческой крови и плазмы, иммунные сыворотки, иммуноглобулины (включая моноклональные антитела), продукты ферментации (включая продукты, получаемые с помощью рекомбинантной ДНК) и диагностические препараты для применения *in vitro* [3].

К тому же термин *биологический препарат* охватывает как продукт в готовой лекарственной форме, так и не расфасованный

материал, предназначенный для получения готовой лекарственной формы [4].

Вышеизложенные определения исчерпывающе характеризуют препараты, относимые к биологическим, как по перечню самих групп препаратов, так и по источникам их получения и методам производства. Термин "биологические препараты", очевидно, возможно использовать в дальнейшем взамен термина "иммунобиологические препараты" с целью гармонизации с терминологией, принятой ЕС и ВОЗ.

Прежде чем перейти к обзору зарубежных Фармакопей, считаем необходимым провести обзор Фармакопей бывшего СССР, действовавших в Украине до принятия Государственной Фармакопеи Украины 1-го издания. Исходя из того, что рассматриваемые препараты и относящиеся к ним положения являются неотъемлемой частью Фармакопей всех стран, в обзоре кратко приведены структуры Фармакопей и изложение их основных положений.

#### *Государственная Фармакопея СССР девятого издания (ГФ X)*

*Часть I. Препараты (частные и групповые статьи).* Эта часть ГФ X [5] содержит статьи на готовые лекарственные средства (ЛС), полученные химическим синтезом в различных лекарственных формах (порошок, раствор, таблетка, драже, присыпка), субстанции, вспомогательные вещества, лекарственное растительное сырье, бактериальные и вирусные препараты (последнее – термин, предшествующий термину «иммунобиологические препараты»).

Бактериальные и вирусные препараты представлены следующими групповыми статьями: аллергены бактериальные и вирусные, анатоксины, сыворотки и вакцины.

Групповые статьи состоят из таких разделов: вводная часть (общие сведения о препаратах, способах их получения, области применения и др.), описание (внешний вид, форма выпуска), испытания, применение, упаковка и хранение.

Групповая статья "Вакцины" дополнительно содержит раздел "Признаки непригодности вакцины".

Переходя от характеристики групповых статей к характеристике частных статей необходимо отметить, что при наличии групповой статьи "Аллергены бактериальные и вирусные" частные статьи на указанную группу препаратов в ГФ X не внесены.

Анатоксины и сыворотки представлены частными статьями, приведенными в Табл. 1.

Вакцины представлены статьями, приведенными в Табл. 2.

Несмотря на отсутствие групповой статьи "Бактериофаги", ГФ X содержит частные статьи на бактериофаг дизентерийный и бактериофаг брюшнотифозный.

Препараты крови в ГФ X представлены частными статьями: "Гамма-глобулин для профилактики кори", "Гамма-глобулин антирабический" и "Гамма-глобулин против клещевого энцефалита".

*Часть II. Общие методы физико-химического, химического и биологического исследования.* В этой части отдельным разделом представлены методы анализа бактериальных препаратов. Описан метод определения остаточного спирта в препаратах гамма-глобулинов (гамма-глобулин для профилактики кори и антирабический гамма-глобулин). В части II представлены также следующие методы исследований:

- Определение формалина в бактериальных препаратах (противоэнцефалитной вакцине, АКДС-вакцине, АДС, АД, АС).

- Определение фенола в бактериальных препаратах.

- Определение мертиолята в бактериальных препаратах.

- Определение рН в вакцинных и сывороточных препаратах.

- Определение окиси алюминия в бактериальных препаратах, сорбированных на гидроксиде алюминия.

- Определение остаточной влаги в лиофилизированных препаратах вакцин и сывороток.

- Определение белка по биуретовой реакции в препаратах гамма-глобулинов и сыворотках, очищенных по методу "Диаферм-3".

- Испытание на электрофоретическую однородность препаратов гамма-глобулинов.

Кроме того, в разделе "Испытания на стерильность" отдельно описан метод "Определение стерильности вакцин, анатоксинов и анатоксических сывороток", который регламентирует порядок отбора проб по ходу технологического процесса.

В то же время в частных статьях на бактериальные и вирусные препараты не приводятся методы определения таких показателей, как бактериологическая чистота, иммуногенность, количество спор и процентное содержание живых спор в ампуле, количество жи-

вых микробов, наличие вакуума в ампуле, содержание активного вируса, стерильность (хотя метод контроля и описан в ГФ X), посторонняя микрофлора, специфическая и общая безвредность, реактогенность, морфология, дисперсность, содержание живых бактерий, соответствие оптическому стандарту, отсутствие диссоциации при посеве на питательные среды, агглютинабельность, идентификация типа вируса, отсутствие посторонних агентов в культуре ткани, нейровирулентность для обезьян, переносимость вакцины на людях, характер роста на специальной среде, прививаемость, термоустойчивость, растворимость, специфическая активность, однако дается ссылка на регламентирующие требования Межреспубликанских технических условий, утвержденных МЗ СССР.

#### *Государственная Фармакопея СССР одиннадцатого издания (ГФ XI)*

ГФ XI состоит из двух выпусков (вып. 1 и вып. 2) [6,7].

Раздел «Общие методы анализа» (вып. 2) содержит изложение общих методов анализа, где даны определения терминов «серия», «проба», «выборка», «упаковочная единица», «точечная проба».

В статье «Стерилизация» описаны и классифицированы методы стерилизации «термический – паровой и воздушный», «химический – газовый и стерилизация растворами», «стерилизация фильтрованием», «радиационный метод стерилизации». В описании методов приведены данные относительно рекомендуемых параметров проведения процессов стерилизации в зависимости от объема (массы), тесты, подтверждающие эффективность условий проведения стерилизации (включая биологический тест), меры предосторожности.

Дано определение стандартных образцов (СО) и их классификация: Государственный стандартный образец (ГСО), рабочие стандартные образцы (РСО) и стандартные образцы веществ-свидетелей (СОВС), приведены условия выпуска и аттестации СО (за исключением СО на иммунобиологические и радиофармацевтические препараты).

Раздел «Биологические методы контроля качества лекарственных средств» содержит описание методов испытаний на токсичность и пирогенность, применяемых для контроля, в том числе, и иммунобиологических препаратов. Для контроля иммунобиологических

препаратов применяется статья «Испытание на стерильность» раздела «Методы микробиологического контроля лекарственных средств», которая на практике дополняется методикой, изложенной в Сборнике инструкций, утвержденном приказом Минздрава СССР № 31 от 13.01.83.

Недостаточность информации в ГФ X и ГФ XI в отношении рассматриваемых препаратов восполнена изданием целого ряда нормативных документов (НД) и фармакопейных статей (ФС), разработанных Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. Одним из основных документов, устанавливающих методы контроля МИБП, является «Сборник инструкций по общим методам контроля стерильности, физико-химических свойств, пирогенности, на отсутствие контаминирующих агентов и токсичности медицинских иммунобиологических препаратов», который действует с 1983 года (методы контроля, включенные в этот документ, приведены в Приложении 1).

В дополнение к методам контроля иммунобиологических препаратов в последующем была введена ФС 42-344ВС-90 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов». ФС содержит «Общие указания», где определены термины «концентрация», «точная навеска», «постоянная масса», «растворитель», «оценка результатов», «квалификация реактивов», «приготовление моющих средств», «контрольный опыт», «хранение растворов», «спирт», дано указание об использовании отраслевых стандартных образцов (ОСО), содержатся рекомендации по применению методов к определенной группе препаратов, приготовлению растворов и реактивов, формулы расчета, построение калибровочных графиков (методы контроля, изложенные в ФС, приведены в Приложении 2).

Разработка ФС регламентировалась Отраслевым стандартом ОСТ 42-28-6-88, содержащим ссылки на методические указания и регламентирующие документы, касающиеся контроля, маркировки и упаковки медицинских иммунобиологических препаратов.

#### *Европейская Фармакопея, 3-е издание (ЕФ 1997)*

Европейская Фармакопея 3-го издания [8] состоит из издания 1997 года и ежегодных к нему дополнений [9].

ЕФ 1997 содержит разделы, посвященные общим замечаниям, методам анализа, материалам контейнеров (материалам первичной упаковки), контейнерам (первичной упаковке), реактивам и др.

В разделе "Общие замечания" (*General Notices*) (1) приведены аббревиатуры и определения, используемые в монографиях на иммуноглобулины, иммунные сыворотки и вакцины ( $LD_{50}$ , MLD и др.), а также аббревиатура, полное наименование, адреса коллекций микроорганизмов.

Перечень сывороток, анатоксинов, вакцин приведен в Табл. 1 и 2, соответственно, препаратов крови - в Табл. 3.

Раздел "Методы анализа" (*Methods of Analysis*) (2) содержит описание методов контроля в том числе и биологических препаратов, а именно: физические и физико-химические методы (2.2.) (*Physical and Physico-Chemical Methods*); идентификацию (*Identification*) (2.3.); испытания на предельное содержание примесей (*Limit Tests*) (2.4.); методы количественного определения (*Assays*) (2.5.); биологические испытания (*Biological Tests*) (2.6.); биологические методы количественного определения (*Biological Assays*) (2.7.); контейнеры (*Containers*) (3.2.).

Перечень используемых методов контроля биологических препаратов, приведенных в обзоре, содержится в Приложениях 3 и 4. В монографиях на вакцины и сыворотки также даются ссылки на материалы, изложенные в разделе "Общие тексты" (*General Texts*) (5.), которые касаются терминологии, проведения специфических тестов на эмбрионах, требований к перевиваемым клеткам. Раздел содержит обширный материал, посвященный статистическому анализу результатов биологических методов количественного определения и испытаний (*Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests*) (5.3).

Раздел "Монографии" (*Monographs*) представлен статьями: "Продукты технологии рекомбинантной ДНК" (*Recombinant DNA Technology, Products of*) (0784), которая определяет требования к клеткам — продуктам рекомбинантной технологии и устанавливает порядок тестирования продуктов, полученных на их основе, "Аллергены" (*Allergen Products*) (1063), "Иммунные сыворотки, предназначенные для человека" (*Immunosera for human use*) (0084), "Вакцины, предназначенные для человека" (*Vaccines for Human*

*Use*) (0153) и др., а также монографиями на биологические препараты.

Из диагностических препаратов в ЕФ 1997 включены препараты туберкулина: "Туберкулин традиционный, предназначенный для человека" (*Tuberculin, Old, For Human Use*) (0152)), "Очищенное белковое производное туберкулина, птичье" (*Tuberculin Purified Protein Derivative, Avian*) (0535)), "Очищенное белковое производное туберкулина, предназначенное для человека" (*Tuberculin Purified Protein Derivative For Human Use*) (0151)).

Дополнение 1999 года к ЕФ 1997 содержит изменения к требованиям, изложенным в разделе "Биологические испытания" (*Biological Tests*) (2.6.). Так, тест "Стерильность" (*Sterility*) (2.6.1.) содержит следующие отличия:

- срок инкубации исследуемой среды продлен от 7 дней до 14 дней;

- расширен спектр тест-штаммов микроорганизмов, используемых для контроля сред. Так, для контроля тиогликолевой среды, кроме аэробных бактерий, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* введен штамм *Pseudomonas aeruginosa*. Для контроля соево-казеиновой среды, кроме *Candida albicans*, предложен штамм *Aspergillus niger*;

- указан pH водного раствора ( $7.1 \pm 0.2$ ), используемого при выполнении теста на стерильность методом мембранной фильтрации, здесь же оговаривается условие нейтрализации антибиотиков в тестируемом образце, антимикробные свойства фильтра, необходимость валидации испытания с использованием мембранной фильтрации и условия валидации с использованием одинаковых объемов каждой из сред;

- внесены редакционные изменения, касающиеся установленного диапазона температур инкубирования, вместо редакции «от 30 °C до 35 °C» указана средняя температура с отклонениями « $32.5 \pm 2.5$  °C»;

- уточнен объем вносимого для инокуляции тестируемого продукта, который определен как 10 % от объема среды, вместо соотношения продукта к среде 1:10 для жидких и 1:100 - для твердых сред.

Дополнение 1999 года содержит измененные монографии на вакцины: гемофильная типа В, конъюгированная (*Hemophilus Type B Conjugate Vaccine*); против гепатита А инактивированная, адсорбированная (*Hepatitis A Vaccine Inactivated, Adsorbed*); коревая (живая) (*Measles Vaccine, Live*); коревая, паротит-

Таблица 1

## Сыворотки и анатоксины

Британская Фармакопея	Европейская Фармакопея	Фармакопея США	ГФХ
Botulinum Antitoxin (Антитоксин ботулинический)	Botulinum Antitoxin (Антитоксин ботулинический)	Botulism Antitoxin (Антитоксин ботулинический)	Сыворотка противоботулиническая типов А, В, С, Е, (очищенная, концентрированная)
Diphtheria Antitoxin (Антитоксин дифтерийный)	Diphtheria Antitoxin (Антитоксин дифтерийный)	Diphtheria Antitoxin (Антитоксин дифтерийный)	Сыворотка противодифтерийная (очищенная, концентрированная)
		Diphtheria Toxoid (Токсоид дифтерийный)	
		Diphtheria Toxoid Adsorbed (Токсоид дифтерийный адсорбированный)	
		Diphtheria and Tetanus Toxoid (Токсоид дифтерийный и столбнячный)	Анатоксин дифтерийный (очищенный, адсорбированный гидроокисью алюминия)
		Diphtheria and Tetanus Toxoid Adsorbed (Токсоид дифтерийный и столбнячный адсорбированный)	Анатоксин дифтерийно-столбнячный (очищенный, адсорбированный гидроокисью алюминия)
Gas-gangrene Antitoxin (Novyi) (Антитоксин газово-гангренозный (Новый))	Gas-gangrene Antitoxin (Novyi) (Антитоксин газово-гангренозный (Новый))		Сыворотка противогангренозная, очищенная, концентрированная (противоперфрингенс типа А, противоэдематиненс, противосептикум)
Gas-gangrene Antitoxin (Perfringens) (Антитоксин газово-гангренозный (Перфрингенс))	Gas-gangrene Antitoxin (Perfringens) (Антитоксин газово-гангренозный (Перфрингенс))		
Gas-gangrene Antitoxin (Septicum) (Антитоксин газово-гангренозный (Септикус))	Gas-gangrene Antitoxin (Septicum) (Антитоксин газово-гангренозный (Септикус))		
Mixed Gas-gangrene Antitoxin (Антитоксин газово-гангренозный смешанный)	Gas-gangrene Antitoxin Mixed (Антитоксин газово-гангренозный смешанный)		
Tetanus Antitoxin (Антитоксин столбнячный)	Tetanus Antitoxin for Human Use (Антитоксин столбнячный, предназначенный для человека)	Tetanus Antitoxin (Антитоксин столбнячный)	Сыворотка противостолбнячная (очищенная, концентрированная)
		Tetanus Toxoid (Токсоид столбнячный)	
		Tetanus Toxoid Adsorbed (Токсоид столбнячный адсорбированный)	Анатоксин столбнячный (очищенный, адсорбированный гидроокисью алюминия)
		Tetanus and Diphtheria Toxoid Adsorbed for Adult use Tuberculin (Токсоид столбнячный и дифтерийный адсорбированный с туберкулином для взрослых)	
Scorpion Venom Antiserum (Антисыворотка к яду скорпиона)			
European Viper Venom Antiserum (Антисыворотка к яду гадюки европейской)	Viper Venom Antiserum, European (Антисыворотка к яду гадюки европейской)		Сыворотка против яда змей гурзы
			Анатоксин стафилококковый (нативный)
			Анатоксин стафилококковый (очищенный, адсорбированный гидроокисью алюминия)
		Antirabies Serum (Антирабическая сыворотка)	

Таблица 2

**Вакцины**

Британская Фармакопея	Европейская Фармакопея	Фармакопея США	ГФХ
Bacillus Calmette-Guerin Vaccine (Вакцина BCG (палочка Кальметта-Герена))	BCG vaccine, freeze-dried (Вакцина противотуберкулезная, лиофилизированная)	BCG Vaccine (Вакцина противотуберкулезная)	Вакцина БЦЖ для внутрикожного применения (сухая)
Percutaneous Bacillus Calmette-Guerin Vaccine (Чрескожная вакцина ВЦЖ)			Вакцина БЦЖ для перорального и накожного применения (сухая)
Cholera Vaccine (Вакцина холерная) LIQUID VACCINE (Жидкая вакцина) DRIED VACCINE (Сухая вакцина)	Cholera vaccine (Вакцина холерная)	Cholera Vaccine (Вакцина холерная)	Вакцина холерная (сухая)
	Cholera vaccine, freeze-dried (Вакцина холерная, лиофилизированная)		
Adsorbed Diphtheria Vaccine (Вакцина дифтерийная адсорбированная)	Diphtheria vaccine (adsorbed) (Вакцина дифтерийная (адсорбированная))	Diphtheria and Tetanus Toxoids and Pertussis Vaccine (Токсоид дифтерийный и столбнячный и вакцина коклюшная)	Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная (адсорбированная гидроокисью алюминия, АКДС-вакцина)
Adsorbed Diphtheria Vaccine for Adults and Adolescents (Вакцина дифтерийная адсорбированная для взрослых и подростков)	Diphtheria and tetanus vaccine (adsorbed) (Вакцина дифтерийная и столбнячная (адсорбированная))		
Adsorbed Diphtheria and Tetanus Vaccine (Вакцина адсорбированная дифтерийная и столбнячная)	Diphtheria and tetanus vaccine (adsorbed) for adults and adolescents (Вакцина дифтерийная и столбнячная (адсорбированная) для взрослых и подростков)		
Adsorbed Diphtheria and Tetanus Vaccine for Adults and Adolescents (Вакцина дифтерийная и столбнячная адсорбированная для взрослых и подростков)	Diphtheria vaccine (adsorbed) for adults and adolescents (Вакцина дифтерийная (адсорбированная) для взрослых и подростков)		
Adsorbed Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccine (Вакцина дифтерийная, столбнячная и коклюшная адсорбированная)	Diphtheria, tetanus and pertussis vaccine (adsorbed) (Вакцина дифтерийная, столбнячная и коклюшная (адсорбированная))		
Inactivated Hepatitis A Vaccine (Вакцина гепатита А (инактивированная))	Hepatitis A vaccine (inactivated) (Вакцина гепатита А (инактивированная))		
Hepatitis B Vaccine (r DNA) (Вакцина гепатита В (r ДНК))	Hepatitis B vaccine (r DNA) (Вакцина гепатита В (r ДНК))		
Inactivated Influenza Vaccine (Split Virion) (Вакцина гриппозная инактивированная)	Influenza vaccine (split virion), (inactivated) (Вакцина гриппозная (целый вирион), (инактивированная))	Influenza Virus Vaccine (Вакцина вирусная гриппозная)	
Inactivated Influenza Vaccine (Whole Virion) (Вакцина гриппозная инактивированная (целый вирион))	Influenza vaccine (whole virion), (inactivated) (Вакцина гриппозная (целый вирион), (инактивированная))		
Inactivated Influenza Vaccine (Surface Antigen) (Вакцина гриппозная инактивированная (поверхностный антиген))	Influenza vaccine (surface antigen), (inactivated) (Вакцина гриппозная (поверхностный антиген), (инактивированная))		
Haemophilus Type B Conjugate Vaccine (Вакцина конъюгатная гемофильная типа В)			

Таблица 2 (Продолжение)

**Вакцины**

Measles Vaccine, Live (Вакцина коревая (живая))	Measles vaccine (live) (Вакцина коревая (живая))	Measles Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная коревая (живая))	
Measles, Mumps and Rubella Vaccine, Live (Вакцина коревая, паротитная и краснушная, живая)	Measles, mumps and rubella vaccine (live) (Вакцина коревая, паротитная и краснушная (живая))	Measles, Mumps, and Rubella Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная коревая, паротитная и краснушная, живая)	
		Measles and Rubella Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная коревая и краснушная живая)	
		Measles and Mumps Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная коревая и паротитная живая)	
Meningococcal Polysaccharide Vaccine (Вакцина менингококковая полисахаридная)	Meningococcal polysaccharide vaccine (Вакцина менингококковая полисахаридная)	Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group A (Вакцина менингококковая полисахаридная группы А)	
		Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group C (Вакцина менингококковая полисахаридная группы С)	
		Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group A and C Combined (Вакцина менингококковая полисахаридная группы А и группы В комбинированная)	
			Вакцина бруцеллезная живая (сухая)
Mumps Vaccine, Live (Вакцина паротитная, живая)	Mumps vaccine (live) (Вакцина паротитная, живая)	Mumps Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная паротитная живая)	Вакцина коклюшная
Pertussis Vaccine (Вакцина коклюшная) PLAN VACCINE (Жидкая вакцина) ADSORBED VACCINE (Адсорбированная вакцина)	Pertussis vaccine (Вакцина коклюшная)	Pertussis Vaccine Adsorbed (Вакцина коклюшная адсорбированная)	
Pertussis vaccine (adsorbed) (Вакцина коклюшная (адсорбированная))	Pertussis Vaccine Adsorbed (Вакцина коклюшная адсорбированная)		
Pneumococcal Polysaccharide Vaccine (Вакцина пневмококковая полисахаридная)	Pneumococcal polysaccharide vaccine (Вакцина пневмококковая полисахаридная)		
			Вакцина клещевого энцефалита (инактивированная культуральная)
			Вакцина сибирязвенная живая "СТИ" (сухая)

Таблица 2 (Продолжение)

**Вакцины**

Inactivated Poliomyelitis Vaccine (Вакцина полиомиелитная инактивированная)	Poliomyelitis vaccine (inactivated) (Вакцина полиомиелитная (инактивированная))		Вакцина Сэбина полиомиелитная, живая (пероральная, типа I, II, III)
Poliomyelitis Vaccine, Live (Oral) (Вакцина полиомиелитная, живая (оральная))	Poliomyelitis vaccine (oral) (Вакцина полиомиелитная (оральная))		
		Poliovirus Vaccine Inactivated (Вакцина полиомиелитная инактивированная)	
		Poliovirus Vaccine Live Oral (Вакцина полиовирусная живая оральная)	
		Poliovirus Vaccine Inactivated (Вакцина полиовирусная инактивированная)	
			Вакцина туляремийная живая (сухая)
Rabies Vaccine (Вакцина против бешенства)	Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures (Вакцина против бешенства, предназначенная для человека, приготовленная в культуре клеток)	Rabies Vaccine (Вакцина против бешенства)	Вакцина антирабическая Ферми (сухая)
Rubella Vaccine, Live (Вакцина краснушная, живая)	Rubella vaccine (live) (Вакцина краснушная (живая))	Rubella and Mumps Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная краснушная и паротитная живая)	
		Rubella Virus Vaccine Live (Вакцина вирусная краснушная живая)	
Tetanus Vaccine (Вакцина столбнячная)	Tetanus vaccine (adsorbed) (Вакцина столбнячная (адсорбированная))		
Adsorbed Tetanus Vaccine (Вакцина столбнячная адсорбированная)			
Typhoid polysaccharide vaccine (Вакцина тифозная полисахаридная)		Typhoid Vaccine (Вакцина брюшнотифозная)	Вакцина брюшнотифозная (гретая)
Typhoid Vaccine (Вакцина брюшнотифозная)	Typhoid vaccine (Вакцина брюшнотифозная)		Вакцина брюшнотифозная (спиртовая сухая)
Typhoid (Strain Ty 21a) Vaccine, Live (Oral) (Вакцина брюшнотифозная (штамм Ty21a), живая (оральная))	Typhoid vaccine (live) (oral, strain Ty 21a) (Вакцина брюшнотифозная (живая) (оральная, штамм Ty21a))		
Typhoid and Tetanus Vaccine (Вакцина брюшнотифозная и столбнячная)	Typhoid vaccine, freeze-dried (Вакцина брюшнотифозная, лиофилизированная)		
Typhus Vaccine (Вакцина сыпнотифозная)			
		Plague Vaccine (Вакцина чумная)	Вакцина противочумная живая (сухая)
		Smallpox Vaccine (Вакцина оспенная)	Вакцина оспенная (сухая)
Varicella Vaccine, Live (Вакцина герпетическая, живая)	Varicella vaccine (live) (Вакцина герпетическая (живая))		
Yellow Fever Vaccine, Live (Вакцина против желтой лихорадки, живая)	Yellow fever vaccine (live) (Вакцина против желтой лихорадки (живая))	Yellow fever Vaccine (Вакцина против желтой лихорадки)	

ная и краснушная (живая) (*Measles, Mumps and Rubella Vaccine (Live)*); паротитная (живая) (*Mumps Vaccine (Live)*); полиомиелитная (инактивированная) (*Poliomyelitis Vaccine (Inactivated)*); антирабическая для человека, приготовленная в культуре клеток (*Rabies Vaccine For Human Use Prepared in Cell Cultures*); краснушная, живая (*Rubella Vaccine, Live*); против желтой лихорадки (*Yellow Fever Vaccine, Live*).

В дополнение 1999 года к ЕФ 1997 введены новые монографии на коклюшную вакцину (ацеллюлярную, компонентную, адсорбированную) (*Pertussis Vaccine (Acellular, Component, Adsorbed)*) и вакцину против клещевого энцефалита (инактивированную) (*Tick-Borne Encephalitis Vaccine (Inactivated)*).

### Британская Фармакопея, 1998 (BP 1998)

Британская Фармакопея [10, 11] представлена двумя томами (Volume I, Volume II) и отдельным томом Ветеринарной Фармакопеи (Veterinary BP).

I том содержит статьи на реактивы и химические вещества. Там же размещена статья "Требования к продукции, полученной по технологии рекомбинантной ДНК" (*Products of Recombinant DNA Technology*).

II том содержит раздел "Монографии, иммунологические препараты" (*Monographs, Immunological Products*), в который включены статьи на иммунные сыворотки и вакцины.

Общая статья "Иммунные сыворотки" включает перечень препаратов и общие по-

Таблица 3  
Препараты крови

Британская Фармакопея	Европейская Фармакопея	Фармакопея США
Albumin Solution (Раствор альбумина)	Albumin Solution, Humen (Раствор альбумина, человеческого)	Albumin Human (Альбумин человека)
Plasma for Fractionation (Плазма для фракционирования)	Human Plasma for Fractionation (Плазма человеческая для фракционирования)	Plasma Protein Fraction (Белковая фракция плазмы)
	Human Coagulation Factor IX, Freeze-Dried (Фактор коагуляции IX, человеческий, лиофилизированный)	Anti-A Blood Grouping Serum (Группоспецифическая сыворотка крови Anti-A)
Antithrombin III Concentrate (Антитромбин III концентрированный)	Human Antithrombin III Concentrate, Freeze-Dried (Антитромбин III человеческий, концентрированный, лиофилизированный)	Anti-B Blood Grouping Serum (Группоспецифическая сыворотка крови Anti-B)
Dried Factor VII Fraction (Высушенная фракция, содержащая фактор VII)		Blood Grouping Serum (Группоспецифическая сыворотка крови)
Dried Factor VIII Fraction (Высушенная фракция, содержащая фактор VIII)	Human Coagulation Factor VIII, Freeze-Dried (Фактор коагуляции VIII, человеческий, лиофилизированный)	Blood Grouping Serum Anti-D, Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e (противо-группоспецифическая сыворотка Anti-A, Anti-D, Anti-C, Anti-E, Anti-c, Anti-e)
Dried Factor IX Fraction (Высушенная фракция, содержащая фактор IX)		Leukocyte Typing Serum (Сыворотка для типирования лейкоцитов)
Dried Prothrombin Complex (Высушенный протромбиновый комплекс)		Blood Grouping Specific Substances A, B, and AB (Группоспецифические вещества крови A, B и AB)
Dried Fibrinogen (Фибриноген высушенный)	Human Fibrinogen, Freeze-Dried (Фибриноген человеческий, лиофилизированный)	Red Blood Cells (Красные клетки крови)
Fibrin Sealant Ki (Фибрин)		Whole Blood (Цельная кровь)
		Platelet Concentrate (Концентрат кровяных пластинок)
Normal Immunoglobulin (Иммуноглобулин нормальный)	Human Normal Immunoglobulin (Иммуноглобулин человека нормальный)	Immune Globulin (Иммунный глобулин)
Normal Immunoglobulin for Intravenous Use (Иммуноглобулин нормальный, для внутривенного введения)	Human Normal Immunoglobulin for Intravenous Administration (Человеческий иммуноглобулин нормальный, для внутривенного введения)	

Таблица 3 (Продолжение)

**Препараты крови**

Anti-D (Rh <sub>0</sub> ) Immunoglobulin (Anti-D (Rh <sub>0</sub> ) иммуноглобулин)	Human Anti-D Immunoglobulin (Человеческий Anti-D иммуноглобулин)	Rh <sub>0</sub> (D) Immune Globulin (Rh <sub>0</sub> (D) иммунный глобулин)
Hepatitis A Immunoglobulin (Иммуноглобулин против гепатита А)	Human Hepatitis A Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин против гепатита А)	
Hepatitis B Immunoglobulin (Иммуноглобулин гепатита В)	Human Hepatitis B Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин против гепатита В)	Hepatitis B Immune Globulin (Иммунный глобулин против гепатита В)
Hepatitis B Immunoglobulin for Intravenous Use (Иммуноглобулин против гепатита В, для внутривенного введения)	Human Hepatitis B Immunoglobulin for Intravenous Use (Человеческий иммуноглобулин против гепатита В, для внутривенного введения)	
Measles Immunoglobulin (Иммуноглобулин противокоревой)	Human Measles Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин противокоревой )	
Rabies Immunoglobulin (Иммуноглобулин против бешенства)	Human Rabies Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин против бешенства )	Rabies Immune Gglobulin (Иммунный глобулин против бешенства)
Rubella Immunoglobulin (Иммуноглобулин противокраснушный)	Human Rubella Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин противокраснушный)	
Tetanus Immunoglobulin (Иммуноглобулин противостолбнячный)	Human Tetanus Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин противостолбнячный)	Tetanus Immune Globulin (Иммунный глобулин, противостолбнячный)
Varicella Immunoglobulin (Иммуноглобулин противогерпетический)	Human Varicella Immunoglobulin (Человеческий иммуноглобулин противогерпетический)	Varicella Immune Globulin (Иммунный глобулин противогерпетический)
		Varicella-Zoster Immune Globulin (Иммунный глобулин против герпес-зостера)
		Pertussis Immune Globulin (Иммунный глобулин противокклюиный)
		Anti-Human Globulin Serum (Сыворотка против человеческого глобулина)

ложения, распространяющиеся на эти препараты.

Общая статья "Вакцины" описывает бактериальные вакцины, бактериальные токсиды, риккетсиозные вакцины, вирусные вакцины, смешанные вакцины. В разделе "Описание" изложены общие сведения о вакцинах, включая вакцины, полученные на основе технологии г-ДНК, приведена ссылка на используемые термины "Терминология, используемая в монографиях на вакцины, предназначенные для человека" (*Terminology Used in Monographs on Vaccines for human use*) (5.2.1.). Отдельно описаны бактериальные вакцины, бактериальные токсиды и вирусные вакцины. Перечень монографий на анатоксины приведен в Табл. 1, на вакцины - в Табл. 2.

Препараты крови (*Blood Products*) представлены отдельным разделом, который содержит монографии на препараты альбуми-

на, иммуноглобулина, фибрина, антитромбина и др. (Табл. 3).

Методы контроля вакцин и сывороток (включая анатоксины) приведены в Приложении 3, препаратов крови - в Приложении 4.

Для общих требований к препаратам и методов, отсутствующих в ВР, даны ссылки на ЕФ, например, для "Иммунных сывороток, предназначенных для человека" (*Immunosera for human use*) (84), "Вакцин, предназначенных для человека" (*Vaccines for human use*) (153), "Статистического анализа результатов биологических методов количественного определения и испытаний" (*Statistical analysis of results of biological assays and tests*) (5.3.) и др. Диагностические препараты в Британской Фармакопее представлены аналогично ЕФ.

**Фармакопее США 23 издания (USP 23)**

Фармакопее США и Национальный Форум (NF) [12] 1995 года, представляет собой

однотомное издание, периодически обновляемое дополнениями (Supplement USP 23-NF 18).

Раздел "Микробиологические испытания" (*Microbiological Tests*) содержит следующие общие тесты, применяемые для анализа, в том числе, и биологических препаратов:

- "Антимикробные консерванты - эффективность" (*Antimicrobial Preservatives - Effectiveness*) <51>;
- "Микробиологические предельные испытания" (*Microbial Limit Tests*) <61>;
- "Испытания на стерильность" (*Sterility Tests*) <71>.

Раздел "Биологические испытания и биологические методы количественного определения" (*Biological Tests and Assays*) включает:

- "Испытание на бактериальные эндотоксины" (*Bacterial Endotoxins Test*) <85>;
- "Испытания на биологическую реактивность, *in vitro*" (*Biological Reactivity Tests, in vitro*) <87>;
- "Испытания на биологическую реактивность, *in vivo*" (*Biological Reactivity Tests, in vivo*) <88>;
- "Разработка и анализ биологических методов количественного определения" (*Design and Analysis of Biological Assays*) <111>;
- "Белок - испытание на биологическое соответствие" (*Protein - Biological Adequacy test*) <141>;
- "Испытание на пирогены" (*Pyrogen Test*) <151>.

Кроме указанных микробиологических и биологических методов испытания раздел USP 23, посвященный общим методам испытаний и количественных определений, содержит главу "Биопрепараты" (*Biologics*) <1041>, где указано, что биологические препараты — это "такие продукты, как антитоксины, антивенины (*antivenins*), кровь, препараты крови, иммунные сыворотки, иммунологические диагностические вспомогательные средства, токсиды, вакцины и родственные продукты, которые производятся по лицензии в соответствии с условиями Федерального Закона о здравоохранении (58-682), принятого 1 июля 1994 года». В разделе приведены основы регулирования реализации готовых фармацевтических препаратов: "Ни один из лицензированных препаратов не может быть продан производителем без предварительного проведения полного комплекса специфических испытаний".

Раздел "Биотехнология: отдельные статьи" (*Biotechnology Derived Articles*) <1045> содержит перечень материалов, которые определены как относящиеся к биотехнологическим:

- "Сфера биотехнологии при разработке статей Фармакопеи" (*Scope of Biotechnology in the Development of Pharmacopeial Articles*);
- "Определение биотехнологии - исторические перспективы". (*Definition of Biotechnology - Historical Perspective*);
- "Технология рекомбинантной ДНК" (*r-DNA Technology*);
- "Моноклональные антитела" (*Monoclonal Antibodies*);
- "Типичные процессы производства" (*Characteristic Production Processes*);
- "Производство на основе рекомбинантной ДНК" (*r-DNA Production*);
- "Производство на основе прокариот (бактерий)" (*Prokaryotic (Bacterial) production*);
- "Производство на основе эукариот (клеток млекопитающих и дрожжей)" (*Eukaryotic (Mammalian cell and Yeast) production*);
- "Производство моноклональных антител" (*Monoclonal antibody production*);
- "Контроль процессов ферментации и культивирования клеток" (*Control of Fermentation and Cell Culture Processes*);
- "Процессы ферментации (бактерии и дрожжи)" (*Fermentations (Bacteria and Yeast)*);
- "Культура эукариотических клеток" (*Eukariotic cell cultures*);
- "Процессы восстановления и очистки" (*Process for Recovery and Purification*);
- "Контроль качества" (*Quality Control*);
- "Состав препарата" (*Product Formulation*);
- "Аналитическая методология" (*Analytical Methodology*);
- "Вопросы, касающиеся стандартных образцов" (*Reference Standard Considerations*);
- "Типовая методология" (*Typical Methodology*);
- "Содержание белка" (*Protein Content*);
- "Аминокислотный анализ" (*Amino acid analysis*);
- "Секвенирование белков" (*Protein Sequencing*);
- "Картирование белков с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии)" (*Peptide mapping by HPLC*);
- "Иммунологические методы количественного определения" (*Immunoassays*);
- "Электрофорез" (*Electrophoresis*);

- "Хроматографические методы" (*Chromatographic methods*);
- "Методы количественного определения" (*Quantitative Assays*);
- "Определение ДНК" (*DNA Determination*);
- "Определение углеводов" (*Carbohydrate Determination*);
- "Определение посторонних и эндогенных агентов" (*Adventitious and endogenous Agent Detection*).

Перечень сывороток и анатоксинов, вакцин, и препаратов крови, включенных в USP 23, приведен в Табл. 1, 2 и 3, соответственно.

Дополнение 7 (15.11.97) содержит измененный раздел "Испытания на биологическую реактивность, *in vitro*" (*Biological Reactivity Tests, in vitro*) <87>.

Дополнение 8 (15.05.98) содержит изменения к разделам "Испытания на стерильность" (*Sterility Tests*) <71>, "Испытания на биологическую реактивность, *in vivo*" (*Biological Reactivity Tests, in vivo*) <88>. В дополнении требования монографий "Качество продуктов биотехнологии: «Анализ экспрессирующей конструкции в клетках, используемых для производства белковых препаратов, получаемых с помощью рекомбинантной ДНК" (*Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products*) <1048>, "Качество биотехнологических продуктов: испытания на стабильность биотехнологических/биологических продуктов" (*Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological products*) <1049> гармонизированы в рамках процесса ICH [13]. Дополнение содержит также изменение к положению "Надлежащая производственная практика" (*Good Manufacturing Practices*) <1077>.

### Обсуждение

В обзоре представлены наиболее общие сведения о биологических препаратах, и, к сожалению, он не может вместить всю широкую гамму специальных вопросов, которые могут заинтересовать специалистов по диагностическим препаратам, некоторым препаратам крови, методам статистического анализа и другим специфическим направлениям.

Используя ту же хронологию в обсуждении материалов, что и при изложении обзора, можно предположить, что развитие ГФ X и ГФ XI во многом совпадало с зарубежными Фармакопеями того же периода. (Обзор ма-

териалов Европейской Фармакопеи 4-го издания (ЕФ 2002), Британской Фармакопеи 1999 года и 2000 года, Фармакопеи США 24 издания, касающихся иммунобиологических (биологических) препаратов, будет представлен в следующих публикациях).

Выбор зарубежных Фармакопей обусловлен прежде всего тем, что Европейская Фармакопея, как базовый документ Европейского Союза (ЕС), должна служить исходным документом в создании разделов Государственной Фармакопеи Украины по иммунобиологическим препаратам. Британская Фармакопея вызывает интерес в вопросе согласования национальных и Европейских требований (положений ЕС), отраженных в Фармакопее. Не менее интересна и Фармакопея США, которая признана на всем североамериканском континенте. Исходя из того, что в Фармакопею США в 1998 году включены материалы International Conference on Harmonisation (ICH), принятые в 1995 году, обновление Фармакопеи США происходит наиболее динамично. Вероятно, что и последующие, принятые ICH в отношении биотехнологических/биологических препаратов документы [14,15], будут включены в Фармакопею США и Европейскую Фармакопею. Нельзя не сказать и о том, что термин "биотехнологические препараты" встречается только в Фармакопее США и в документах ICH, хотя и является широко применимым научным термином, определяющим как способы производства, так и производимые продукты.

Британская Фармакопея, как уже было отмечено в обзоре и видно из представленных данных (Табл. 1, 2 и Приложения 3, 4) содержит, в основном, идентичные Европейской Фармакопее монографии на биологические продукты и использует те же (сохраняя нумерацию) методы анализа.

Особое место среди биологических препаратов занимают вакцины. Тот факт, что в состав авторских коллективов по разработке монографий Европейской Фармакопеи на человеческую кровь и препараты крови (Group № 6B), сыворотки и вакцины (Group № 15) включены представители ВОЗ, говорит об особом внимании ВОЗ и ЕС к этой группе препаратов. Подавляющее число рекомендаций ВОЗ в отношении характеристик вакцин, методов их контроля, условий производства и др., включены во все Фармакопеи. Так, рекомендация ВОЗ «Общие требования к стерильности биологических препаратов» [16] содержит разделы, которые присутствуют во

## Приложение 1

**Методы контроля, включенные в Сборник инструкций 1983 года по общим методам контроля стерильности, физико-химических свойств, пирогенности, на отсутствие контаминирующих агентов и токсичности медицинских иммунобиологических препаратов**

- Требование к качеству тиогликолевой среды
- Стерильность
- Ростовые свойства
- Нейтрализующие свойства
- Методика контроля качества тиогликолевой среды
- Определение стерильности
- Определение ростовых свойств
- Характеристика тест-штаммов
- Характеристика и подготовка тест-штаммов для посева в тиогликолевую среду
- Посев тест-штаммов в тиогликолевую среду
- Определение нейтрализующих свойств
- Учет результатов контроля
- Методика контроля стерильности биологических препаратов
- Правила отбора образцов препаратов для контроля стерильности
- Отбор образцов готового препарата в полуфабрикате
- Отбор образцов препарата в процессе разлива
- Отбор образцов готового (разлитого, высушенного) препарата
- Техника проведения контроля стерильности
- Схема контроля стерильности
- Учет результатов контроля стерильности
- Приложение:
- Тиогликолевая среда
- Бульон Хоттингера
- Агар Хоттингера
- Среда Романова
- Среда Тароцци
- Раствор для разведения культуры
- Среда для получения спор
- Требования, предъявляемые к боксам

**Наименование метода**

- Определение белкового азота с реактивом Несслера (*включая метод с использованием трихлоруксусной кислоты, анализы препаратов с содержанием белкового азота 0.01-0.40 мг/мл и 2.5-10.0 мкг/мл, метод с использованием фосфорновольфрамовой кислоты*)
- Определение общего азота с реактивом Несслера
- Определение белка с биуретовым реактивом
- Определение белка по методу Лоури (*включая методы без предварительного осаждения белка и без осаждения белка*)
- Определение аминного азота формальным титрованием
- Определение сахаров с антроновым реактивом
- Определение О-ацетильных групп
- Определение фосфора
- Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина
- Определение однородности сывороточных препаратов методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы
- Определение агрегатов и фрагментов в препаратах иммуноглобулина методом гельфльтрации
- Определение молекулярных параметров полисахаридов
- Определение содержания бычьего сывороточного альбумина методом ракетного иммуноэлектрофореза
- Определение белка в иммуноглобулинах диагностических флуоресцирующих, сухих
- Определение молярного соотношения ФИТЦ/белок в иммуноглобулинах диагностических флуоресцирующих, сухих
- Определение степени очистки препарата от примеси свободного флуорохрома (ФИТЦ)
- Определение фенола (*включая метод с реактивом Фолина и спектрофотометрический метод*)
- Определение формальдегида
- Определение мертиолята (*колориметрический и полярографический методы*)
- Определение гидроксилamina
- Определение остаточного спирта
- Определение натрия хлорида
- Определение ионов алюминия
- Определение сульфат-ионов (*включая анализ препаратов с содержанием сульфат-ионов 50-450 мкг/мл и менее 50 мкг/мл*)
- Определение показателей дисперсности сорбента и сорбированных препаратов
- Определение массовой доли влаги
- Определение точности разлива в лиофилизированных препаратах (*включая весовой и колориметрический методы*)
- Определение прозрачности и цветности
- Определение концентрации водородных ионов (рН)
- Определение равномерности разлива сорбированных препаратов

## Приложение 3

## Методы контроля вакцин и сывороток в Европейской Фармакопее и Британской Фармакопее

- 2.2.3. Potentiometric determination of pH (*Потенциометрическое определение pH*)
- 2.2.25 Visible and ultraviolet spectrophotometry (*Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области*)
- 2.2.30 Size-exclusion chromatography (*Эксклюзивная хроматография*)
- 2.2.34 Thermogravimetry (*Термогравиметрия*)
- 2.4.18 Free formaldehyde (*Свободный формальдегид*)
- 2.4.19 Alkaline impurities in fatty oils (*Щелочные примеси в жирных маслах*)
- 2.5.9 Semi-micro determination of nitrogen by sulphuric acid digestion (*Полумикрометод определения азота путем растворения серной кислотой*)
- 2.5.12 Semi-micro determination of water (*Полу-микрометод определение воды*)
- 2.5.14 Aluminium in adsorbed vaccines (*Алюминий в адсорбированных вакцинах*)
- 2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. Polysaccharide vaccines: (*Фенол в иммуносыворотках и вакцинах. Полисахаридные вакцины*)
- 2.5.16 - protein (*белок*)
- 2.5.17 - nucleic acids (*нуклеиновые кислоты*)
- 2.5.18 - phosphorus (*фосфор*)
- 2.5.19 - O-acetyl (*О-ацетильные группы*)
- 2.5.20 - hexosamines (*гексозамины*)
- 2.5.21 - uronic acid (*уроновая кислота*)
- 2.5.22 - methylpentoses (*метилпентозы*)
- 2.5.23 - sialic acid (*сиаловые кислоты*)
- 2.5.31 Ribose in polysaccharide vaccines (*Рибоза в полисахаридных вакцинах*)
- 2.6.1 Sterility (*Стерильность*)
- 2.6.8 Pyrogens (*Пирогены*)
- 2.6.9 Abnormal toxicity (*Аномальная токсичность*)
- 2.6.12 Total viable aerobic count (*Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов*)
- 2.6.13 Specified micro-organisms (*Отдельные виды микроорганизмов*)
- 2.6.14 Bacterial endotoxins (*Бактериальные эндотоксины*)
- 2.6.16 Extraneous agents in viral vaccines (*Чужеродные агенты в вирусных вакцинах*)
- 2.6.18 Neurovirulence of live viral vaccines (*Нейровирулентность живых вирусных вакцин*)
- 2.6.19 Neurovirulence of poliomyelitis vaccine (oral) (*Нейровирулентность полиомиелитной вакцины (оральной)*)
- 2.7.1 Immunochemical methods (*Иммунохимические методы*)
- 2.7.6 Assay of diphtheria vaccine (adsorbed) (*Количественное определение дифтерийной вакцины (абсорбированной)*)
- 2.7.7 Assay of pertussis vaccine (*Количественное определение коклюшной вакцины*)
- 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed) (*Количественное определение столбнячной вакцины (абсорбированной)*)
- 5.2.1 Terminology: Vaccines (*Терминология: Вакцины*)
- 5.2.2 SPF Chicken flocks (*Выводки цыплят, свободные от специфических патогенов*)
- 5.2.3 Human diploid cell (vaccine production) (*Человеческие диплоидные клетки (производство вакцин)*)

всех регламентирующих материалах Европейской Фармакопеи:

«Отбор проб готовой продукции» с указанием формулы расчета количества отбираемых образцов в зависимости от объема серии;

«Инкубация» с указанием длительности и диапазона температур инкубации.

«Жидкая среда с тиогликолятом».

«Среда из продуктов переваривания соевых бобов и казеина».

«Испытание на стерильность с помощью мембранной фильтрации».

«Испытание на присутствие микоплазм».

Специальные выпуски рекомендаций ВОЗ посвящены требованиям к конкретным вакцинам [17]. Эти материалы содержат, кроме вопросов производства вакцин (весьма широко и подробно рассмотренных), требования к контрольным испытаниям готовых препаратов, что само собой подразумевает методы контроля, вносимые в Фармакопею.

Табл. 1, 2 и 3 составлены по принципу группировки препаратов, что дает возможность сравнить монографии, представленные в рассматриваемых Фармакопеях.

Очевидно, что предшествовать созданию концепции представления иммунобиологи-

Приложение 4

**Методы контроля препаратов крови в Европейской Фармакопее и Британской Фармакопее**

- 2.2.3 Potentiometric determination of pH (*Потенциометрическое определение pH*)
- 2.2.22 Atomic emission spectrometry (*Атомно-эмиссионная спектрометрия*)
- 2.2.23 Atomic absorption spectrometry (*Атомно-абсорбционная спектрометрия*)
- 2.2.24 Thin-layer chromatography (*Тонкослойная хроматография (TLC)*)
- 2.2.25 Liquid chromatography (*Жидкостная хроматография*)
- 2.2.31 Electrophoresis (*Электрофорез*)
- 2.2.35 Osmolality (*Осмоляльность*)
- 2.3.1. Identification reactions (*Реакции идентификации*)
- 2.5.9 Semi-micro determination of nitrogen by sulphuric acid digestion (*Определение азота полумикрометодом, путем растворения серной кислотой*)
- 2.5.10 Semi-micro determination of water (*Определение воды полумикрометодом*)
- 2.6.1. Sterility (*Стерильность*)
- 2.6.8 Pyrogens (*Пирогены*)
- 2.6.15 Prekallikrein activator (*Активатор прекалликреина*)
- 2.6.16 Anticomplementary activity of immunoglobulins (*Антикомплементарная активность иммуноглобулинов*)
- 2.6.20 Anti-A and anti-B hemagglutinins (indirect method) (*Анти-А и анти-В гемагглютинины (непрямой метод)*)
- 2.7.1 Immunochemical methods (*Иммунохимический метод*)
- 2.7.4 Assay of coagulation factor VIII (*Количественное определение фактора коагуляции VIII*)
- 2.7.5 Assay of heparin (*Количественное определение гепарина*)
- 2.7.9 Fc function of immunoglobulins (*Fc- функция иммуноглобулинов*)
- 2.7.10 Assay of coagulation factor VII (*Количественное определение фактора коагуляции VII*)
- 2.7.11 Assay of coagulation factor IX (*Количественное определение фактора коагуляции IX*)
- 2.7.12 Heparin in coagulation factor concentrates (*Гепарин в концентратах фактора коагуляции*)
- 3.2.1 Glass containers for pharmaceutical use (*Стекланные контейнеры для фармацевтического использования*)
- 3.2.3 Sterile plastic containers for blood and blood components (*Стерильные пластиковые контейнеры для крови и ее компонентов*)

ческих препаратов в Государственной Фармакопее Украины должна разработка терминологии, за основу которой может быть принят разработанный в настоящее время в рамках ICH «Медицинский словарь ICH по терминологии для регулирующей деятельности» (*ICH Medical Dictionary for Regulatory Activities [Med DRA] Terminology*).

## ЛИТЕРАТУРА

1. ОСТ 42-28-6-88. Фармакопейные статьи на медицинские иммунобиологические препараты. Построение, содержание, изложение и оформление.
2. Директива Комиссии ЕС от 13.07.1991 г. Об установлении основных принципов и правил надлежащей производственной практики лекарственных препаратов для человека. Приложение 2. Производство биологических лекарственных средств, предназначенных для человека // Належащая производственная практика лекарственных средств. — Киев, 1999. — С. 111-118.
3. Good manufacturing practice for biological products// World Health Organization. - Geneva, 1993. - No. 834. - Annex 3 - P. 220-230. - (Technical Report Series).
4. Приложение 2. Руководящие указания для национальных органов, касающиеся обеспечения качества лекарственных препаратов // Всемирная организация здравоохранения. - Женева, 1994. - № 822 - С. 63. (Серия технических докладов ВОЗ).
5. Государственная Фармакопея СССР. — 10-е изд. - М.: Медицина, 1968. - 1065 с.
6. Государственная Фармакопея СССР: Вып.1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11 — е изд., доп. - М.: Медицина, 1987. - 332 с.
7. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11 — е изд., доп. - М.: Медицина, 1990. — 392 с.
8. European Pharmacopoeia, 3<sup>rd</sup> ed. - Strasbourg, 1997. — 1799 p.
9. European Pharmacopoeia, 3<sup>rd</sup> ed. Supplement 1999. - Strasbourg, 1997. — 1015 p.
10. British Pharmacopoeia. - 1998. - V. I. - London, HMSO. - 1389 p.
11. British Pharmacopoeia. - 1998. - V. II. - London, HMSO. - 1390 p.
12. The United States Pharmacopoeia, 23 ed. Supplements 1-9. - USPC, 1995.
13. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. — Geneva: ICH Secretariat, 1995. — 29 p.
14. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. 1997. - 42 p.
15. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological products. ICH Harmonized Tripartite Guideline. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. - Geneva: ICH Secretariat, 1998. — 38 p.
16. Всемирная организация здравоохранения. Серия технических докладов ВОЗ. — Женева, 1990. - № 800.
17. Приложение 1. Требования к полиомиелитной вакцине (пероральной) // Всемирная организация здравоохранения. — Женева, 1990. - № 800. — С. 39-80. — (Серия технических докладов ВОЗ).

## Резюме

Сельнікова О.П., Думанський В.Д., Моїсєєва А.В., Гергієвський В.П., Піотровська А.Г., Крупа Н.О.

**Імунобіологічні (біологічні) препарати в національних і міжнародних Фармакопеях**

У статті наведений порівняльний аналіз і узагальнення спадку, що склався, подання імунобіологічних (біологічних) препаратів у Фармакопеях колишнього СРСР, а також у Європейській Фармакопеї, Британській Фармакопеї та Фармакопеї США того ж періоду. Огляд може бути використаний при розробці концепції подання імунобіологічних (біологічних) препаратів у Державній Фармакопеї України.

## Summary

Selnikova O.P., Dumansky V.D., Moitseeva A.V., Georgiyevskiy V.P., Piotrovskaya A.G., Krupa N.A.

**Immunobiological (biological) preparations in national and international Pharmacopoeias**

In this article the comparative analysis and the summarizing of an existing heritage of immunobiological (biological) preparations presentation in Pharmacopoeias of former USSR as well as in European Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia and US Pharmacopoeia of the same period of time is given. The review may be used when developing the conception of immunobiological (biological) preparations presentation in the State Pharmacopoeia of Ukraine.

**Сельнікова Ольга Петровна.** Окончила Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (1972). Директор Научно-исследовательского института эпидемиологии и инфекционных болезней ім. Л.В. Громашевского (1997). Директор ГП "Центр иммунобиологических препаратов" (1994). Доктор мед. наук.

**Думанский Валентин Дмитриевич.** Окончил Киевский технологический институт пищевой промышленности (1990). Зам. директора ГП "Центр иммунобиологических препаратов" (1999). Канд. тех. наук.

**Моисеева Анна Вячеславовна.** Окончила Национальный медицинский университет ім. О.О. Богомольця (1988). Ученый секретарь ГП "Центр иммунобиологических препаратов" (1996).

**Георгиевский Виктор Петрович.** Директор ГНЦАС. Директор ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр". Председатель Бюро Редакционной коллегии Государственной Фармакопеи Украины. Доктор фарм. наук. Профессор. Академик Международной инженерной академии, Инженерной академии Украины и Нью-Йоркской Академии наук. Засл. деятель науки и техники Украины.

**Піотровська Алла Григорьевна.** Окончила біологічний факультет Харківського державного університету. Ученый секретарь ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр" (1992).

**Крупа Наталья Александровна.** Окончила Харківський державний університет (1978). Главный научный специалист ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр" (1992).

УДК 659.1:661.12

Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Маслова Н.Ф., Пивень Е.П., Стандара В.М.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

## Защита прав интеллектуальной собственности в области создания лекарственных средств

Определены возможные объекты защиты интеллектуальной собственности нового лекарственного средства. Показана структура объектов интеллектуальной собственности ГНЦЛС, установлены наиболее часто защищаемые. Для принципиально нового лекарственного средства определен наиболее полный пакет охранных документов. Представлены основные формы реализации инноваций в области создания лекарственных средств и факторы, влияющие на выбор соответствующей формы.

Среди объектов интеллектуальной собственности, создаваемых творческими усилиями работников различных отраслей науки и производства, особое место занимают изобретения на стыке фармации, химии и медицины, связанные с разработкой, производством и использованием лекарственных средств (ЛС).

Это обусловлено прежде всего тем, что ЛС относятся к социально важной продукции и играют определяющую роль в лечении и профилактике заболеваний населения.

Ведущей организацией по созданию ЛС в Украине является Государственный научный центр лекарственных средств (ГНЦЛС), в стенах которого детально отработана и функционирует гибкая система, включающая полный цикл необходимых исследований по разработке принципиально новых лекарственных средств и препаратов-генериков (практически всех фармакотерапевтических групп), субстанций и вспомогательных веществ [1]. В соответствии с действующими законодательными и нормативными актами разработка нового лекарственного средства предполагает [2]:

- поиск биологически активных веществ (растительного и животного происхождения или синтетических);
- разработку технологий их производства, проведение доклинических фармакологических и токсикологических испытаний;
- разработку новых лекарственных форм и технологий их производства;
- разработку методов контроля качества, аналитической и нормативно-технологической документации на производство препаратов;
- клинические испытания;
- постановку препаратов на промышленное производство.

Совокупность результатов вышеперечисленных исследований составляет интеллектуальный продукт. Его защита является одним из обязательных этапов в системе разработки ЛС и предполагает проведение мероприятий, направленных на решение вопросов изобретательской и патентно-информационной деятельности ГНЦЛС, обеспечение правовой охраны объектов промышленной собственности, получение охранных документов, закрепление за собой права на созданный объект интеллектуальной собственности.

Исходя из требований, предъявляемых к созданию, производству и реализации лекарственных препаратов, а также учитывая область их применения, определены следующие объекты защиты интеллектуальной собственности:

- вещество (биологически активное вещество (БАВ) - субстанция или вспомогательное вещество);
- способ получения вещества;
- готовое лекарственное средство (ЛС) (композиция биологически активного вещества и вспомогательных веществ);
- способ получения ЛС;
- применение вещества, известного в качестве лекарственного средства, по новому назначению;
- способ лечения;
- методы анализа веществ и ЛС;
- устройства для получения ЛС;
- защита названия лекарственного средства знаком для товаров и услуг;
- защита внешнего вида лекарственного средства промышленным образцом (форма, упаковка).

За годы 80-летней научной деятельности ГНЦЛС разработал более 400 лекарственных средств в виде субстанций, лекарственных форм и изделий медицинского назначения

(следует отметить, что средняя продолжительность разработки принципиально нового лекарственного препарата в мире составляет 10-12 лет). Право интеллектуальной собственности разработок ГНЦАС нашло отражение в 360 охранных документах, среди которых объектами защиты наиболее часто выступали: способ получения лекарственных средств (веществ и готовых лекарственных форм) и составы лекарственных средств (биологически активное вещество или композиция биологически активного вещества и вспомогательных веществ) (Таблица). Это объясняется спецификой научно-исследовательской и технологической деятельности ГНЦАС, обусловленной разработкой и внедрением в производство ГЛС, в том числе принципиально новых, и направленной на поиск способов получения принципиально новых субстанций, на получение различных лекарственных форм и создание новых препаратов, на разработку ресурсосберегающих и малоотходных технологий, в частности, при переработке лекарственного растительного сырья, на усовершенствование существующих технологий получения препаратов с целью достижения прогрессивных научно-технических решений для выпуска конкурентоспособной продукции с низкой себестоимостью.

В настоящее время в ГНЦАС продолжается работа по защите прав интеллектуальной собственности на свои разработки. Только в 1998 году получено 25 патентов Украины. К началу 2000 года ГНЦАС сам или в соавторстве с заводами Украины стал обладателем

143 патентов (в т.ч. 40 патентов Российской Федерации) на составы и способы получения ЛС, при этом поддержание патентов осуществляется ГНЦАС, в основном, за счет средств, поступивших по хозяйственным договорам с предприятиями-производителями препаратов [1].

При разработке стратегии защиты интеллектуальной собственности ГНЦАС в качестве основных целей определены: обеспечение конкурентоспособности создаваемых инноваций и максимизация получаемого ГНЦАС дохода в результате их реализации. Достижение этих целей заключается в наиболее полной правовой защите созданного интеллектуального продукта, обеспечении его юридической неуязвимости, что создает на рынке благоприятные условия для реализации и получения прибыли на протяжении всего периода действия полученных охранных документов. Для принципиально нового ЛС формирование наиболее полного пакета охранных документов заключается в защите следующих объектов интеллектуальной собственности: биологически активное вещество, состав лекарственного средства, способ получения, применение по новому назначению, способ лечения, методы анализа, устройства, товарный знак, промышленный образец.

В последние годы ГНЦАС с целью более быстрого насыщения рынка Украины жизненно необходимыми конкурентоспособными отечественными препаратами-генериками по доступным для населения ценам разработал более 150 наименований ГЛС 17 фар-

Таблица

**Структура объектов интеллектуальной собственности ГНЦАС, защищенных охранными документами (патентами и авторскими свидетельствами)**

Объект интеллектуальной собственности	Количество охранных документов	
	единиц	%
Способ получения лекарственных средств (веществ и готовых лекарственных форм)	233	65
Составы лекарственных средств (композиция биологически активного соединения и вспомогательных веществ)	80	22
Устройства для получения лекарственного средства	23	7
Методы анализа вещества и готовых лекарственных средств	19	5
Способы лечения	5	1
<b>Всего:</b>	<b>360</b>	<b>100</b>

макотерапевтических групп, импортные аналоги которых хорошо зарекомендовали себя на рынке. Наибольшую часть составляют препараты сердечно-сосудистого действия, противовоспалительные средства, препараты для лечения инфекционных болезней, препараты для гастроэнтерологии, гепатологии, иммунологии, аллергологии, а также препараты, содержащие витамины. В процессе исследований было установлено, что ряд этих препаратов может быть защищен охранными документами.

В качестве примера следует привести противовирусное лекарственное средство «Герпевир» в форме мази, разработанное в процессе воспроизводства крема «Зовиракс» (Великобритания). Активным действующим веществом этого средства является ацикловир - дорогостоящая субстанция, закупаемая по импорту. При разработке отечественного аналога сотрудники ГНЦАС смогли подобрать такой качественный и количественный состав вспомогательных веществ, который обеспечил синергизм действия ацикловира: при вдвое меньшем его количестве сохранился высокий уровень специфической активности, расширился спектр показаний, значительно сократилось количество негативных побочных эффектов и противопоказаний. Состав лекарственного средства «Герпевир» защищен патентами Украины и Российской Федерации.

При создании противогрибкового лекарственного средства «Миконазол», содержащего в качестве активного вещества миконазола нитрат (аналог «Микозолон», Венгрия), качественный и количественный состав вспомогательных веществ, разработанный сотрудниками ГНЦАС, также позволил значительно повысить уровень и расширить спектр специфической активности препарата, сократить количество негативных побочных эффектов и противопоказаний. Состав этого лекарственного средства также защищен патентами Украины и Российской Федерации.

При воспроизводстве составов препаратов-генериков возможна их защита через способ получения готовой лекарственной формы.

В связи с тем, что созданный интеллектуальный продукт в качестве товара имеет двойственный характер, т.е. объектом продажи может выступать не только лицензия на использование научно-технических достижений, «ноу-хау», но и сама готовая продукция,

произведенная на основании разработанной технологии, важное значение имеет выбор формы реализации полученных в процессе научных изысканий результатов [3, 4]. В области создания ЛС реализация инноваций может осуществляться через сбыт готового препарата, произведенного в условиях собственного производства на базе разработанной научно-технической документации (технологии производства ЛС), создание совместного предприятия или подконтрольного филиала по производству данной продукции, продажу лицензии, патентов, «ноу-хау», заключение хозяйственного договора на разработку препарата и др. Конечно, выбор той или иной формы реализации инновации зависит от целого ряда факторов, основными из которых являются: особенности созданного ЛС и сегментов рынка его реализации; вид технологии; сложившаяся на рынке конъюнктура; наличие препаратов-аналогов; правовая защита и конкурентоспособность разработки; производственные и финансовые возможности разработчика и покупателя и т.д. При этом наиболее приоритетными критериями выбора формы реализации инновации выступают:

- недопустимость снижения конкурентоспособных позиций разработчика в результате передачи своей технологии;

- максимизация доходов от разработки путем решения оптимизационной задачи. Выбирается вариант, который приносит наилучшие коммерческие результаты, т.е. является экономически наиболее эффективным;

- стремление проникнуть на новый, в том числе зарубежный, рынок. В этом случае продажа лицензии используется прежде всего как средство освоения нового рынка.

В связи с тем, что ГНЦАС с начала своей деятельности является государственной научной организацией, в структуре которой производство лекарственных средств отсутствует, а своих финансовых средств для его организации недостаточно, также как и для проведения НИР за счет собственных резервов, основными формами реализации интеллектуального продукта в настоящее время являются заключение хозяйственных договоров и продажа лицензий.

В целом, стратегия защиты интеллектуальной собственности и реализации инноваций осуществляется в соответствии с общей стратегией ГНЦАС и тесно увязывается с его основными задачами и целями.

**Выводы**

В результате исследований определены возможные объекты защиты интеллектуальной собственности при разработке нового ЛС. На основании проведенного анализа структуры объектов интеллектуальной собственности ГНЦЛС установлено, что наиболее часто объектами защиты выступают способ получения и составы лекарственных средств. Для принципиально нового ЛС предложен наиболее полный пакет охранных документов. Сформулирована цель и определена стратегия защиты интеллектуальной собственности. Установлены приоритетные критерии выбора формы реализации инноваций в области создания лекарственных средств.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Маслова Н.Ф. Вклад Государственного научного центра лекарственных средств в развитие фармацевтической промышленности и обеспечение здравоохранения Украины современными лекарственными средствами // Фармаком.- 1999. - № 3/4. - С. 20-26.
2. Государственный научный центр лекарственных средств (к 75-летию со дня основания) // Фармаком.- 1995. - № 8/9. - С. 7-17.
3. Альшин В.М. Инновации и рынок: стратегия, управление, эффективность. Сер. Общественные науки и социальный прогресс. - М., 1992. - Вып. 10. - С. 14-22.
4. Коноваленко М. Маркетинговая деятельность на рынке научно-технической продукции // Интеллектуальна власність — 1999. - № 7. - С. 17-20.

**Резюме**

Георгієвський В.П., Діхтярьов С.І., Маслова Н.Ф., Півень О.П., Стандара В.М.

**Захист прав інтелектуальної власності в галузі створення лікарських засобів**

Визначені можливі об'єкти захисту інтелектуальної власності нового лікарського засобу. Показана структура об'єктів інтелектуальної власності ДНЦЛЗ, установлені ті, які найчастіше захищаються. Для принципово нового лікарського засобу визначений найбільш повний пакет охоронних документів. Представлені основні форми реалізації інновацій у галузі створення лікарських засобів і чинники, що впливають на вибір відповідної форми.

**Summary**

Georgiyevskiy V.P., Dikhtyarev S.I., Maslova N.F., Piven E.P., Standara V.M.

**Protection of intellectual property rights in the field of pharmaceuticals creation**

The possible subjects of a new medicine intellectual property protection are determined. The structure of SSCD intellectual property subjects is demonstrated and the most protected ones are established. The most complete package of protective documentation for a fundamentally new medicine is determined. The main forms of realization of innovations in the field of pharmaceuticals creation and the factors influencing on the appropriate form selection are presented.

**Георгиевский Виктор Петрович.** Директор ГНЦЛС. Директор ГП "Научно-экспертный фармакопейный центр". Председатель Бюро Редакционной коллегии Государственной Фармакопеи Украины. Гл. редактор журнала "Фармаком". Доктор фарм. наук. Профессор. Академик Международной инженерной академии, Инженерной академии Украины и Нью-Йоркской Академии наук. Засл. деятель науки и техники Украины.

**Дихтярев Сергей Иванович** (р.1951). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1973). Работает в ГНЦЛС (с 1975). Зам. директора по научной работе (1990). Зав. лабораторией фитоферментных препаратов. Доктор фарм. наук (1992). Член Редакционного совета ГФУ.

**Маслова Наталья Федоровна.** Окончила Харьковский государственный университет (1971). Работает в ГНЦЛС (с 1972). Ученый секретарь (1991). Зав. лабораторией биохимической фармакологии (1994). Доктор биол. наук. Профессор (1994).

**Пивень Елена Петровна.** Окончила Харьковский инженерно-экономический институт (1977). Зав. лабораторией маркетинговых и технико-экономических исследований ГНЦЛС (1999). Канд. эконом. наук (1988).

**Стандара Валентина Михайловна.** Окончила Государственный институт культуры по специальности «Информатик высшей квалификации» (1971) и Всесоюзный государственный институт повышения квалификации руководящих работников по специальности «Патентовед» (1971). Работает в ГНЦЛС (с 1972). Зав. патентно-лицензионным сектором (1985).

## Синтез та вивчення фармакологічної дії

УДК 54.057:547.831.9:547.551.4:616-002.5

Украинец И.В., Абдель Насер Х.Н. Дакка,  
Безуглый П.А., Горохова О.В., Сидоренко Л.В.  
Национальная фармацевтическая академия Украины

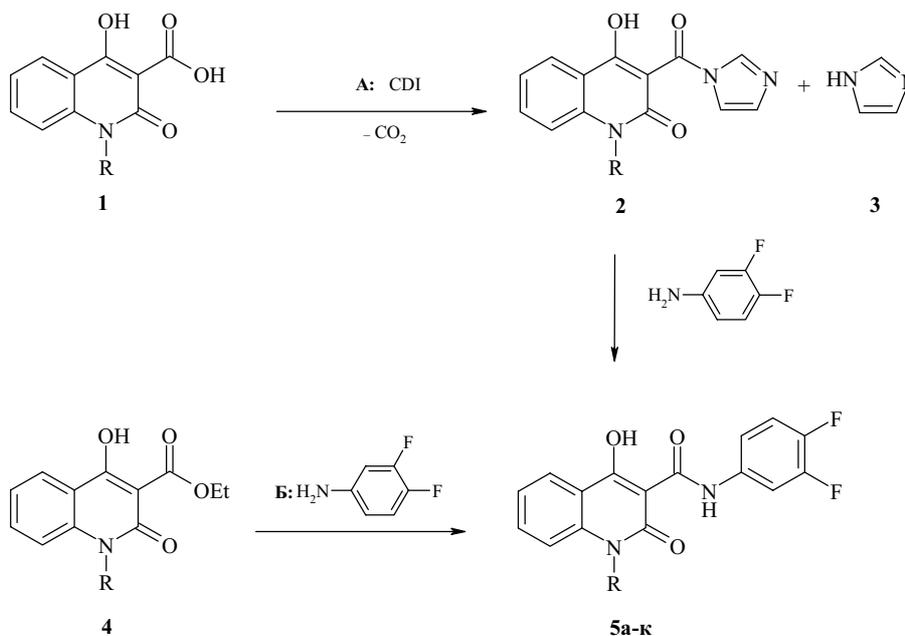
### Синтез и биологические свойства 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот

Изучена возможность использования N,N'-карбонилдимидазола в синтезе 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот, строение которых подтверждено спектроскопией ПМР и встречным синтезом. Приведены результаты исследования противотуберкулезной активности синтезированных соединений.

При изучении противотуберкулезных свойств орто-, мета- и пара-монофторзамещенных анилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот нами было установлено, что наибольший интерес для дальнейших исследований представляют мета-изомеры, оказывающие *in vitro* выраженный антимикробный эффект не только по отношению к *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, но и к комплексу *Mycobacterium avium* [1, 2].

В продолжение исследований в данной области, настоящее сообщение, цель которого — изучить влияние на противотуберкулезные свойства второго атома фтора в анилидном фрагменте, посвящено 3',4'-дифторанилидам 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-кар-

боновых кислот. Синтез таких структур возможен взаимодействием 3,4-дифторанилина с кислотами (1), либо с их этиловыми эфирами (4). Ранее нами было показано, что прямое амидирование 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот анилинами в кипящем ДМФА осуществить не удастся [1]. Однако, после активации кислотной компоненты этих соединений, например, N,N'-карбонилдимидазолом (CDI), целевые 3',4'-дифторанилиды 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот (5) могут быть получены с препаративно высокими выходами (метод А). Указанный метод, разработанный и описанный Штабом [3], основан на образовании ацилимидазолов (2), которые далее



5: а) R = H; б) R = CH<sub>3</sub>; в) R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; г) R = CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>; д) R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; е) R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; ж) R = *i*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; з) R = C<sub>3</sub>H<sub>11</sub>; и) R = *i*-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>; к) R = C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>

способны спонтанно реагировать с аминами, образуя соответствующие амиды. Побочный продукт рассматриваемой реакции — имидазол (**3**) — легко растворим как в воде, так и во многих органических растворителях, поэтому проблем с очисткой амидов, как правило, не возникает. При необходимости ацилимидазолы можно выделить в чистом виде [4], хотя обычно их подвергают дальнейшим химическим превращениям непосредственно в реакционной смеси. Как известно [5], подобные имидазолиды нашли широкое применение в органической химии и для других трансформаций карбоновых кислот, так как они по своей реакционной способности сравнимы с хлорангидридами, однако получают-ся значительно легче и, кроме того, гораздо удобнее в работе.

Тем не менее для получения анилидов (**5**) более подходящим является метод Б, то есть термолиз эквимольных количеств анилина и эфира соответствующей хинолин-3-карбоновой кислоты (**4**), поскольку он позволяет исключить из синтетической схемы две стадии: гидролиз эфиров, а затем и активацию полученных кислот (**1**) N,N'-карбонилдиимидазолом. Во-первых, это с учётом неизбежных потерь на каждой из стадий практически уравнивает оба метода по выходам конечных продуктов, а, во-вторых, без каких-либо расчетов вполне очевидно, что метод Б гораздо дешевле.

Все синтезированные анилиды **5(a-к)** представляют собой бесцветные кристаллические вещества с четкими температурами плавления, не растворимые в воде, эфире и спирте, растворимые в ДМФА и ДМСО. Их строение подтверждено данными элементно-

го анализа и спектрами ПМР (Табл. 1, 2), а на отдельных примерах — встречным синтезом.

Как и в случае монофторзамещенных анилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот [1, 2], в спектрах ПМР соединений **5(a-к)** сигналы протонов 4-ОН-групп и N-алкильных заместителей при атоме азота хинолонового фрагмента идентифицируются достаточно легко (Табл. 2). Из сигналов ароматических протонов однозначно интерпретировать удается только протоны Н-5 и Н-8 хинолонового ядра, тогда как протоны Н-7 и Н-6 проявляются в виде двух мультиплетов с протонами Н-2' и Н-5',6' анилида общей интенсивностью 2 и 3Н каждый (Табл. 2).

Противотуберкулёзная активность 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот **5(a-к)** изучена Национальным институтом аллергических и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения США (контракт № 01-AI-45246) радиометрическим методом [6-10]. Анализируя полученные при этом экспериментальные данные (Табл. 3), а также сопоставляя их с результатами предыдущих исследований [1, 2], можно сделать вывод, что в структуре анилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот наличие атома фтора в положении 4 анилидного фрагмента нежелательно, поскольку такая модификация приводит либо к существенному снижению противотуберкулёзных свойств, либо к полной их утрате.

#### Экспериментальная часть

Спектры ПМР синтезированных веществ записаны на приборе Bruker AC-300 в растворе ДМСО-D<sub>6</sub>, рабочая частота 300.13 МГц,

Таблица 1

#### Характеристики 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот (**5**)

Соединение	Брутто-формула	Т.пл, °С (ДМФА-этанол)	Вычислено, %			Найдено, %			Выход по способу, %
			С	Н	N	С	Н	N	
5а	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	> 300	60.76	3.19	8.86	60.53	3.33	8.78	Б – 94
5б	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	222-224	61.82	3.66	8.48	61.90	3.52	8.54	А – 91 Б – 82
5в	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	191-193	62.79	4.10	8.14	62.88	4.21	8.02	Б – 80
5г	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	160-162	64.04	3.96	7.86	64.19	3.78	7.74	Б – 78
5д	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	175-177	63.68	4.50	7.82	63.51	4.42	7.97	Б – 85
5е	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	154-156	64.51	4.87	7.52	64.65	4.90	7.43	Б – 74
5ж	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	189-191	64.51	4.87	7.52	64.62	4.81	7.60	Б – 77
5з	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	131-133	65.28	5.22	7.25	65.11	5.27	7.18	Б – 80
5и	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	135-137	65.28	5.22	7.25	65.37	5.15	7.33	Б – 88
5к	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132-134	65.99	5.54	7.00	65.82	5.66	7.12	Б – 83

Таблица 2

Спектры ПМР синтезированных соединений,  $\delta$ , м.д.

Соединение	ОН (1H, с)	NH (1H, с)	H аром.				R
			H-5 (1H, д)	H-7 + H-2' (2H, м)	H-8 (1H, д)	H-6 + H-5',6' (3H, м)	
5а	16.03	12.80	8.00	7.92-7.65	7.41	7.36-7.20	12,00 (1H, с, NH)
5б	16.22	12.79	8.17	7.90-7.75	7.62	7.40-7.22	3.72 (3H, с, Me)
5в	16.20	12.80	8.18	7.90-7.74	7.63	7.39-7.21	4.39 (2H, к, NCH <sub>2</sub> ); 1.33 (3H, т, Me)
5г	16.27	12.70	8.19	7.89-7.71	7.53	7.40-7.237	5.99 (1H, м, CH=); 5.17 (2H, м, =CH <sub>2</sub> ); 4.97 (2H, д, NCH <sub>2</sub> )
5д	16.21	12.80	8.16	7.91-7.74	7.60	7.38-7.20	4.28 (2H, т, NCH <sub>2</sub> ); 1.74 (2H, м, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.06 (3H, т, Me)
5е	16.19	12.80	8.17	7.92-7.72	7.59	7.39-7.21	4.30 (2H, т, NCH <sub>2</sub> ); 1.71 (2H, м, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.50 (2H, м, CH <sub>2</sub> Me); 1.00 (3H, т, Me)
5ж	16.24	12.82	8.15	7.91-7.74	7.61	7.39-7.23	4.20 (2H, д, NCH <sub>2</sub> ); 2.21 (1H, м, CH); 1.00 (6H, д, Me x 2)
5з	16.20	12.80	8.18	7.89-7.73	7.59	7.38-7.21	4.22 (2H, т, NCH <sub>2</sub> ); 1.70 (2H, кв, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.41 (4H, м, (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Me); 0.98 (3H, т, Me)
5и	16.21	12.81	8.19	7.91-7.75	7.55	7.37-7.22	4.30 (2H, т, NCH <sub>2</sub> ); 1.82 (1H, м, CH); 1.60 (2H, к, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.04 (6H, д, Me x 2)
5к	16.20	12.80	8.18	7.90-7.76	7.59	7.37-7.21	4.28 (2H, т, NCH <sub>2</sub> ); 1.70 (2H, кв, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.41 (6H, м, (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Me); 0.92 (3H, т, Me)

внутренний стандарт - ТМС. Все микробиологические исследования проведены в рамках программы ТААСФ — Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility.

*3',4'-Дифторанилид 1-метил-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислоты (5б).*

**Метод А.** К раствору 2.19 г (0.01 моль) 1-метил-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислоты в 15 мл ДМФА (использован безводный ДМФА для пептидного синтеза фирмы «Fluka») прибавляют 1.62 г (0.01 моль) N,N'-карбонилдиимидазола и выдерживают на песчаной бане при температуре 100 °С до прекращения выделения CO<sub>2</sub> (около 60 мин). Прибавляют 1.29 г (0.01 моль) 3,4-дифторанилина и оставляют на 3-4 ч при комнатной тем-

пературе, после чего реакционную смесь разбавляют водой. Выделившийся осадок анилида (5б) отфильтровывают, промывают водой, сушат.

**Метод Б.** Смесь 2.47 г (0.01 моль) этилового эфира 1-метил-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислоты и 1.29 г (0.01 моль) 3,4-дифторанилина выдерживают на песчаной бане при 180 °С - 200 °С в течение 5 мин, после чего прибавляют 50 мл этанола, тщательно перемешивают и фильтруют.

Смешанная проба образцов анилида (5б), полученного различными методами, не дает депрессии температуры плавления, спектры ПМР полученных образцов идентичны.

Таблица 3

**Противотуберкулёзная активность 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихиолин-3-карбоновых кислот (5)**

Соединение	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294	
	Ингибирование роста в концентрации 6.25 мкг/мл, %	МИК, мкг/мл
5а	0	—
5б	89	> 6.25
5в	0	—
5г	61	> 6.25
5д	0	—
5е	0	—
5ж	11	> 6.25
5з	32	> 6.25
5и	5	> 6.25
5к	58	> 6.25

### Выводы

Изучены различные варианты получения, и осуществлен синтез 3',4'-дифторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихиолин-3-карбоновых кислот.

На основании сравнительной оценки противотуберкулёзной активности синтезированных соединений и их структурных аналогов — монофторзамещенных анилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихиолин-3-карбоновых кислот — установлено отрицательное влияние атома фтора в пара-положении анилидного фрагмента на проявлении веществами изученного класса антимикобактериальных свойств.

### ЛИТЕРАТУРА

- Украинец И.В., Абдель Насер Х.Н. Дакках, Таран С.Г. и др. Синтез и изучение противотуберкулёзных свойств 2'-фторанилидов 1-R-2-оксо-4-гидроксихиолин-3-карбоновых кислот // Физиологически активные вещества. — 2000. — № 1(29). — С. 18-21.
- Украинец И.В., Абдель Насер Х.Н. Дакках, Безуглий П.О. та ін. Синтез та протитуберкульозна активність 3'- та 4'-фторанілідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихіолін-3-карбонових кислот // Вісник фармації. — 2001. — № 1 (25). — С. 9-12.
- Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза: Пер. с англ. / Под ред. И.Л.Кнунянца и Р.Г.Костяновского. — М.: Мир, 1970. — Т. 2. — С. 119-121.
- Pat. USA 4959363, IPC<sup>5</sup> C 07 D 215/233, C 07 D 265/30, A 61 K 31/47, A 61 K 31/535. Quinolonecarboxamide compounds, their preparation and use as antivirals / Wentland M.P.; Sterling Drug Inc.
- Общая органическая химия / Под ред. Бартона и У.Д. Оллиса. — Т. 4. Карбоновые кислоты и их производные. Соединения фосфора / Под ред. О.И.Сазерленда: Пер. с англ. / Под ред. Н.К.Кочеткова, Э.Е.Нифантьева и М.А.Членова. — М.: Химия, 1983. — С. 47-52.
- Collins K.S., Franzblau S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 1997. — Vol. 41. — P. 1004-1009.

- Heifets L.B. Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis / In: Drug Susceptibility in the Chemotherapy of Mycobacterial Infections. - Ed. Heifets L.B. — Boca Raton: CRC Press, 1991. — P. 89-122.
- Inderleid C.B., Nash K.A. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, 4<sup>th</sup> ed. — Ed. Lorian V. — Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. — P. 127-175.
- Inderleid C.B., Salfinger M. Antimycobacterial agents and susceptibility tests: mycobacteria / In: Manual of Clinical Microbiology. - Ed. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover R.H. — Washington D.C.: ASM Press, 1995. — P. 1385-1404.
- Siddiqui S.H. Radiometric (BACTEC) tests for slowly growing mycobacteria / In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. - Ed. Isenberg H.D. — Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992. — Vol. 1. — P. 5.14.2-5.14.25.

### Резюме

Украинец И.В., Абдель Насер Х.Н. Дакках, Безуглий П.О., Горохова О.В., Сидоренко Л.В.

### Синтез і біологічні властивості 3',4'-дифторанілідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихіолін-3-карбонових кислот

Вивчена можливість використання N,N'-карбонілдіімідазолу в синтезі 3',4'-дифторанілідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихіолін-3-карбонових кислот, будова яких підтверджена спектроскопією ПМР та зустрічним синтезом. Наведені результати дослідження протитуберкульозної активності синтезованих сполук.

### Summary

I.V. Ukrainets, Abdel Naser H.N. Dakkah, P.A. Bezugly, O.V. Gorokhova, L.V. Sidorenko

### Synthesis and biological properties of 1-R-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids 3',4'-difluoroanilides

A possibility of N,N'-carbonyldiimidazole use in the synthesis of 3',4'-difluoroanilides of 1R-2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids has been studied. Their structure is confirmed by PMR spectroscopy and countersynthesis. The results of the antituberculosis activity of the compounds obtained study have been given.

**Украинец Игорь Васильевич** (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Работает в НФАУ (с 1984). Доктор хим. наук (1992). Профессор (1995).

**Абдель Насер Х.Н. Дакках** (р. 1969). Окончил Национальную фармацевтическую академию Украины (1999). Аспирант кафедры фармацевтической химии.

**Безуглий Петр Авксентиевич** (р. 1939). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1966). Зав. кафедрой фармацевтической химии НФАУ (с 1985). Доктор фарм. наук (1981). Профессор (1982).

**Горохова Ольга Викторовна**. Окончила Харьковский фармацевтический институт (1989). Работает на кафедре фармацевтической химии НФАУ (с 1981). Канд. хим. наук (1993). Доцент (1996).

**Сидоренко Людмила Васильевна**. Окончила Харьковский фармацевтический институт (1994). Работает на кафедре фармацевтической химии НФАУ (с 1997). Канд. фарм. наук (1998). Доцент (2001).

## Одержання лікарських і допоміжних речовин

УДК 615.281: 661.183.6.001.5

Зайцев О.І.

Національна фармацевтична академія України

### Вивчення технологічних факторів створення комплексної лікарської субстанції пролонгованої дії "Декацеол" на основі синтетичних алюмосилікатів

Проведено дослідження процесу іонного обміну розчину декаметоксину на цеоліті NaA. Встановлено, що швидкість іонообміну залежить від кінетики хімічної взаємодії, а не від дифузії реагуючих речовин. Вивчено вплив технологічних факторів на концентрацію декаметоксину в цеоліті. Засобами математичного моделювання розрахована максимальна іонообмінна здатність цеоліту до декаметоксину, яка складає  $0.1 \pm 0.005$  % (мас) і обмежується поверхнею часток цеоліту.

Синтетичні алюмосилікати (цеоліти типу NaA) мають певні важливі властивості, які можуть бути використані при створенні лікарських субстанцій. До таких властивостей відносяться адсорбційна [1] та іонообмінна здатність [2].

Іонообмінна здатність дозволяє зв'язати активні катіони біологічно активних речовин (БАР) і тим самим, по-перше, зменшити їх токсичність, по-друге, відповідно до закону діючих мас та кінетики іонного обміну, забезпечити повільне вивільнення БАР, і тим самим пролонгувати дію лікарського засобу.

Адсорбційна здатність синтетичних цеолітів сприяє адсорбції токсинів [3].

Відповідно до зазначених властивостей цеолітів був проведений пошук БАР, здатних до іонного обміну. Найбільш здатні до іонного обміну із синтетичним цеолітом NaA сполуки, що утримують іон амонію. Тому для введення до структури цеоліту був вибраний препарат на основі органічних амонійних основ — декаметоксин.

Іонообмін найбільш доцільно проводити у водних розчинах [4]. У процесі іонного обміну катіони декаметоксину з розчину обмінюються з катіонами натрію, які знаходяться в структурі синтетичного цеоліту NaA.

На повноту іонного обміну (досягнення максимуму концентрації декаметоксину в цеоліті) впливають такі технологічні параметри:

- температура процесу;
- початкова концентрація декаметоксину в розчині;
- тривалість процесу;
- співвідношення об'єму розчину та маси цеоліту;

- інтенсивність змішування.

#### Експериментальна частина

Для отримання комплексної лікарської субстанції пролонгованої дії "Декацеол" була створена лабораторна установка, подібно [2]. Розчин декаметоксину в реактор подавали на цеоліт. Певний час систему термостатували, потім розділяли на вакуум-фільтрі, промивали водою дистильованою і висушували на повітрі або у сушильній шафі (при температурі 100 °C).

Коливання технологічних параметрів здійснювали в такому інтервалі:

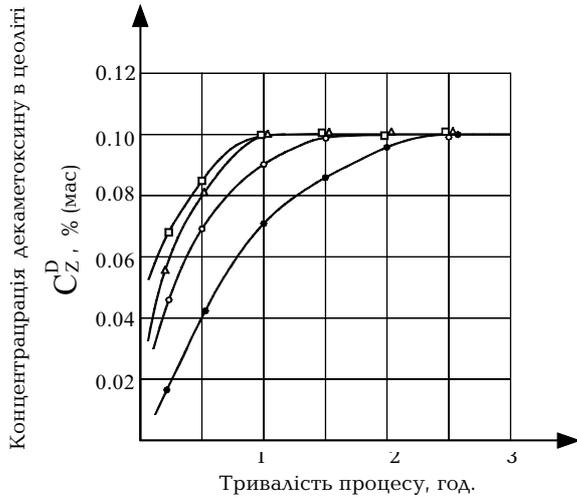
- температура процесу 30 °C - 95 °C ;
- початкова концентрація декаметоксину в розчині  $0.2\% \div 2$  % (мас);
- тривалість процесу 0.5 — 3 год;
- співвідношення об'єму розчину (мл) і маси цеоліту (г): 5:1  $\div$  20:1;
- інтенсивність змішування: швидкість обертання мішалки 0.5 об/с — 10 об/с.

Після кожного досліду розчин аналізували на вміст декаметоксину відповідно з [5]; а осад - на вміст натрію методом атомно-абсорбційної полуменевої спектроскопії.

#### Обговорення результатів

Проведені дослідження показали вплив технологічних параметрів на повноту іонного обміну. На Рис. 1 показана залежність концентрації декаметоксину в цеоліті від тривалості процесу при різних температурах термостаткування. Як видно, цеоліт насичується до максимальної концентрації 0.1 % (мас) декаметоксину. Це пов'язано з тим, що молекули декаметоксину, маючи великі розміри, не можуть проходити у "вікна" цеолітових структур і тому обмінюються іонами тільки з

Рисунок 1



**Залежність концентрації декаметоксину в цеоліті від тривалості процесу при різних температурах термостатування:** □ - 95°C; Δ - 85°C; ○ - 60°C; ● - 30°C

поверхневими елементарними комірками [6] цеолітових часток.

Проведені досліді з визначення діаметра цеолітових часток седиментаційним методом (Табл.1) вказують на наявність у розчині часток меншого діаметру, ніж у сухому стані [2]. Це пов'язано з набуханням часток цеоліту та їх дробленням [4].

Таблиця 1

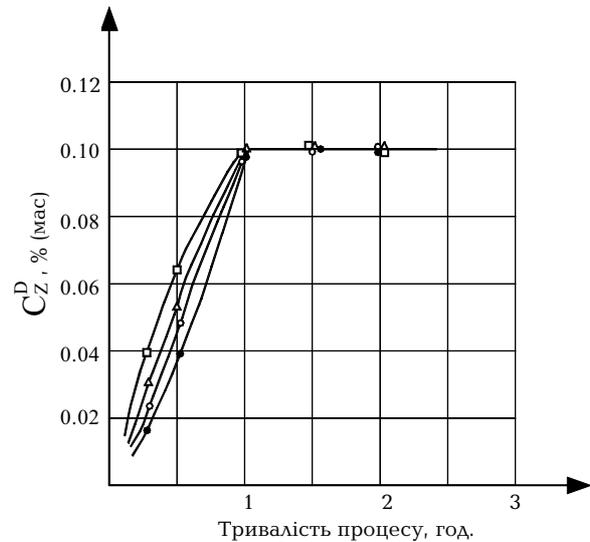
**Параметри процесу осадження часток цеоліту**

Показник	Проба				
	1	2	3	4	5
Швидкість осадження, мм/год	3.45	2.9	3.17	2.64	3
Діаметр часток, мкм	~1.2	1.1	1.15	1.05	1.12
Значення критерію Рейнольдса, $Re \cdot 10^6$	1.4	1.1	1.25	0.95	1.15

Визначений діаметр часток цеоліту в розчині дозволив розрахувати кількість та розмір елементарних комірок у частках цеоліту та їх поверхню. Встановлено поверхневу іонообмінну здатність цеоліту до декаметоксину, яка складає  $0.095 \pm 0.105$  % (мас) із урахуванням похибки  $\pm 5$  %. Розрахований діаметр елементарних комірок (13.18 Е) у порівнянні з [4] дає похибку  $\pm 7$  %.

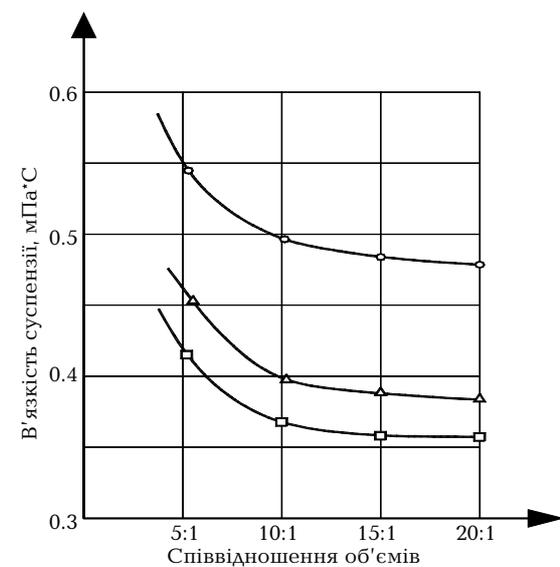
На Рис.2 представлені дані досягнення рівноваги іонного обміну в залежності від швидкості обертання мішалки та тривалості процесу. Як видно, рівновага досягається

Рисунок 2



**Залежність концентрації декаметоксину в цеоліті від тривалості процесу при різних швидкостях обертання мішалки:** □ - 20 об/с; Δ - 15 об/с; ○ - 10 об/с; ● - 5 об/с

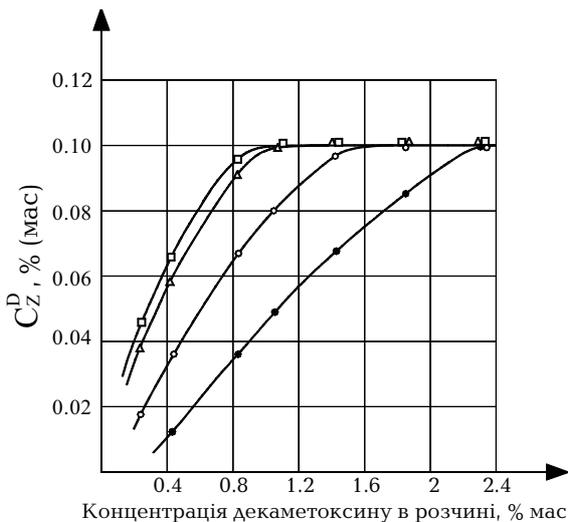
Рисунок 3



**Залежність в'язкості суспензії від співвідношення об'єму розчину до маси цеоліту при різних температурах:** □ - 95°C; Δ - 85°C; ○ - 60°C

протягом однієї години. Швидкість обертання мішалки незначно впливає на кінетику. Це, безумовно, говорить про те, що швидкість іонообміну залежить не від дифузії, а від кінетики хімічної взаємодії. Але, щоб частки цеоліту знаходилися в суспендованому стані, треба перемішувати розчин. Згідно з [7], оптимальна швидкість обертання мішалки складає 1.61 об/с.

Рисунок 4



**Залежність рівноважних концентрацій іонного обміну при різних температурах процесу:**  
 □ - 95 °С; Δ - 85 °С; ○ - 60 °С; ● - 30 °С

Співвідношення реагуючих мас за зазначених умов практично не впливають на значення рівноважних концентрацій, але суттєво змінюють в'язкість суспензій.

Із Рис. 3 видно, що при співвідношенні об'єму розчину до маси цеоліту менше 10:1, в'язкість зростає в квадратичній залежності, що призводить до більших затрат енергії.

Збільшення співвідношення об'єму розчину до маси цеоліту буде призводити до збільшення об'єму розчину, а не до зростання маси субстанції.

На Рис. 4 наведені ізотерми рівноважних концентрацій іонного обміну, із яких видно, що максимальні концентрації декаметоксину в цеоліті досягаються при обробці цеоліту початковим розчином декаметоксину з концентрацією 0.95±1 % (мас) та перебігу процесу при температурі 85±95 °С.

**Висновки**

1. Встановлено, що процес іонного обміну розчину декаметоксину на цеоліті проходить в умовах кінетики хімічної взаємодії, а не дифузії реагуючих речовин.

2. Доведено, що вміст декаметоксину в цеоліті обмежується іонообміном на поверхні часток цеоліту і досягає максимального значення 0.1±0.05 % (мас).

3. Максимальна іонообмінна здатність цеоліту до декаметоксину встановлюється за таких технологічних умов:

- концентрація декаметоксину в початковому розчині 0.95-1 % (мас);
- тривалість процесу – 1 год;
- температура процесу – 85 °С ÷ 95 °С;
- співвідношення об'єму розчину до маси цеоліту – 10:1;
- швидкість обертання мішалки – 1.6 об/с.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Сорбенты и их клиническое применение: Пер. с англ. / Под ред. К. Дтиордана. – К.:Вища школа, 1989. – 400 с.
2. Зайцев О.І., Молчанов В.І., Жуковін В.І., Жуковина О.В. Фізико-хімічні аспекти отримання синтетичних алюмосилікатів для створення лікарських засобів комплексної дії // Фармаком. – 2001. - № 1. – С.33-36.
3. Жуковина О.В., Зайцев О.І., Жуковін В.І., Чушов В.І. Використання синтетичних цеолітів як адсорбентів токсичних речовин // Вісник фармації. – 1997. - № 2. - С.120-121.
4. Челищев Н.Ф., Бернштейн Б.Г., Володин В.Ф. Цеолиты – новый тип минерального сырья. – М.: Недра, 1987. – 176 с.
5. ФС 42У – 46 – 152 – 97. Декаметоксин.
6. Челищев Н.Ф. Ионнообменные свойства минералов. – М.: Наука, 1973. – 203 с.
7. Справочник химика. Том V. - Л.: Химия, 1968. - 948 с.

**Резюме**

Зайцев А.И.

**Изучение технологических факторов создания комплексной лекарственной субстанции пролонгированного действия «Декацеол» на основе синтетических алюмосиликатов.**

Проведены исследования процесса ионного обмена раствора декаметоксина на цеолите NaA. Установлено, что скорость ионообмена зависит от кинетики химических взаимодействий, а не от диффузии реагирующих веществ. Изучено влияние технологических факторов на концентрацию декаметоксина в цеолите. Средствами математического моделирования рассчитана максимальная ионообменная способность цеолита к декаметоксину, которая составляет 0.1±0.005 % (масс) и ограничивается поверхностью частиц цеолита.

**Summary**

Zaitsev A.I.

**Investigation of complex medicinal substance with prolonged action "Decaceol" on the basis of synthetic aluminosilicates creation technological factors**

The examinations of the ion exchange process of decamethoxine solution on zeolite NaA were conducted. It was stated that the ion exchange rate depends on kinetics of chemical interactions and not on the diffusion of reactants. Influence of technological factors on decamethoxine quantity in zeolite was studied. By methods of mathematical modelling the maximum ion-exchange ability of zeolite to decamethoxine that is equal to 0.1±0.005% (m) and restricted with a surface of zeolite particles is calculated.

**Зайцев Олександр Іванович** (н. 1961). Закінчив Харківський політехнічний інститут (1983). Зав. каф. інженерних та інформаційних технологій НФАУ (1992). Канд. тех. наук (1987). Доцент (1991).

## Біотехнологічні дослідження

УДК 591.441 + 615.361.014.413.451.16

Иванов Л.В., Бызов В.В., Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

### Некоторые биофармацевтические свойства экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезёнки

Методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии изучено молекулярно-массовое распределение фракций экстракта криоконсервированных фрагментов свиной селезёнки. Установлено, что основными составляющими экстракта являются вещества пептидной природы и нуклеотиды. С помощью методов спиновых и флуоресцентных зондов показано, что пептидная фракция экстракта эффективно связывается с мембранами модельных и интактных клеток.

В настоящее время во многих странах происходит бурное развитие биотехнологий, в том числе, создание биопрепаратов на основе фетального сырья [1], а также ксеноорганов: селезенки, печени, надпочечников и других тканей и органов животных [2,3,4]. Это связано с увеличивающимся в последние годы интересом ученых к потенциальному многообразию и возможностям биологически активных веществ, содержащихся в различных тканях и органах.

Создание тканевых препаратов требует комплексных исследований, направленных на выделение и фракционирование биологически активных веществ (БАВ), их анализ, изучение мембранотропных свойств [5]. В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины получен экстракт криоконсервированных фрагментов ксеноселезёнки свиной (ЭКФКС) [6].

Настоящее исследование посвящено определению общей концентрации пептидов, входящих в состав экстракта, изучению молекулярно-массового распределения фракций ЭКФКС, а также определению его мембранотропных свойств.

#### Объект и методы исследования

Общую концентрацию пептидов в ЭКФКС определяли модифицированным методом Лоури с помощью реактива Фолина – Чикольте [7].

Для определения молекулярно-массового распределения фракций препарата использовали метод высокоэффективной гель-проникающей хроматографии (ВЭГПХ). Для определения молекулярных масс (М.м.) пептидных фракций использовали несколько реперных (стандартных) веществ пептидной природы: фенилаланин (М.м. 165), инсулин (сред-

няя М.м. 5600), димер инсулина (средняя М.м 11000) и бычий сывороточный альбумин (БСА) (средняя М.м. 65000). При этом средняя М.м. БСА сравнима со средней М.м. многих белков - гемоглобина, сывороточного альбумина и т.д.; инсулин моделирует короткие пептиды, ароматическая аминокислота фенилаланин входит в состав многих белков.

Условия анализа: прибор фирмы «Waters», модель «Allians», с диодно-матричным детектором; колонка TSK SW 2000, размером 7 мм\*600 мм. Подвижная фаза: буферный раствор карбоната аммония (рН 7.0) - ацетонитрил (70:30). Скорость подвижной фазы - 1 мл/мин, объем пробы - 50 мкл.

Молекулярные массы пептидных фракций изучаемого препарата устанавливали по временам удерживания вышеуказанных стандартных веществ. Для установления состава фракций препарата, отличающихся по молекулярной массе, были получены УФ-спектры в области поглощения от 220 нм до 400 нм.

Для изучения сродства пептидов ткани селезенки к липосомам и эритроцитам использовали методы спиновых и флуоресцентных зондов [5,8,9].

Для изучения сродства БАВ ткани селезенки к липосомам в качестве флуоресцентного зонда использовали 1-анилинонафталин-8-сульфонат(1,8-АНС) производства фирмы «Serva» (Германия) [5, 9].

Для изучения сродства пептидов ткани селезенки к эритроцитам использовали спинмеченый прогестерон: прегн-4-ен-3,20 - диол[17,16<sub>a</sub>]-2,2-диметилксазолидин-нитроксид [8].

Спиновые и флуоресцентные зонды вводили во взвесь липосом или эритроцитов в виде концентрированных водных (флуорес-

центный зонд) или водно-спиртовых (спиновый зонд) растворов.

Концентрация спиновых зондов в образцах составляла 50 мкмоль/л, а концентрация флуоресцентных зондов - 5 мкмоль/л. Спиновые зонды вводили во взвесь эритроцитов в виде водно-спиртовых растворов с конечным содержанием спирта не более 0.5 %.

Липосомы получали путем ультразвуковой обработки многослойных везикул из фосфатидилхолина с концентрацией 0.05 % при частоте 22 кГц в 0.1 М трис-буферном растворе (рН 7.2) по методике, описанной в [10]. Эритроциты крови человека получали из эритроцитарной массы, отмытой от плазмы центрифугированием, и разбавленной в 3 раза изотоническим раствором, состоящим из 0.1 М раствора натрия хлорида и 0.05 М фосфатного буферного раствора рН 7.2.

Флуоресценцию зонда 1,8-АНС возбуждали при длине волны 365 нм, максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали при длине волны 475 нм. Сродство пептидов к липосомам оценивали по изменению интенсивности флуоресценции зонда в липосомах в присутствии изучаемых веществ.

Для оценки вращательной подвижности спиновых зондов в исследуемых объектах использовали параметры  $h_0/h_{+1}$  и  $h_0/h_{-1}$  спектров электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР), где  $h_0$ ,  $h_{+1}$  и  $h_{-1}$  - интенсивности компонентов спектра с величиной магнитного квантового числа ядра  $N^{14}$  (M), соответственно равной 0, +1 и -1. Эти параметры пропорциональны времени корреляции вращательной диффузии  $t_c$  зонда (время, за которое спиновый зонд поворачивается на 1 радиан) и определяются из спектров ЭПР [8].

Спектры ЭПР регистрировали с помощью радиоспектрометра Р13-01 с термоприставкой при температуре 37.5 °С, спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра «Hitachi» MPF-2A.

Спектры ЭПР регистрировали при напряженности магнитного поля 3448 Гс, при этом ВЧ модуляция составляла 0.5 Гс, ширина развертки магнитного поля - 100 Гс, время протяжки спектра - 200 с, постоянная времени - 0.05 мс.

В данной работе исследовался экстракт, полученный из фрагментов селезенки свиньи, криоконсервированных в присутствии 20 % раствора ПЭО 1500 и замороженных с медленной скоростью охлаждения.

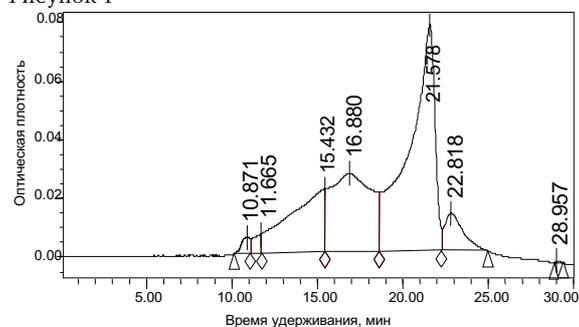
Экстракт получали путём инкубирования предварительно отогретых фрагментов ткани

в физиологическом растворе в течение 1 ч. При дальнейшем инкубировании скорость увеличения концентрации биологически активных веществ значительно уменьшается, и увеличение времени инкубирования свыше 1 ч не представляется целесообразным. Общая концентрация пептидов в исследуемом образце экстракта составляла 0.42 мг/мл.

### Результаты и обсуждение

Результаты определения молекулярно-массового распределения фракций ЭКФКС при длине волны 214 нм представлены на хроматограмме (Рис. 1). Как видно из хроматограммы, в образце имеется несколько фракций пептидов с различными временами удерживания, соответствующими различным молекулярным массам.

Рисунок 1



**Хроматограмма экстракта криоконсервированных фрагментов селезенки свиньи при длине волны 214 нм**

В Табл. 1 представлены некоторые количественные характеристики хроматограммы ЭКФКС.

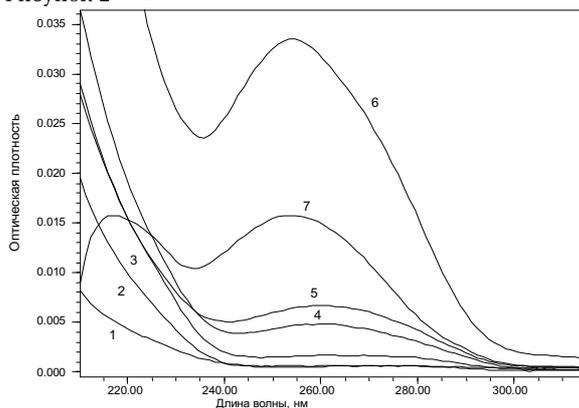
Таблица 1  
**Количественные характеристики хроматограммы ЭКФКС**

Фракция	Время удерживания, мин	Площадь пика фракции	Удельный вес площади пика фракции, %
1	10.871	205530.00	1.21
2	11.665	191206.00	1.13
3	15.432	3109372.00	18.35
4	16.880	4453655.00	26.28
5	21.578	8044793.00	47.47
6	22.818	930722.00	5.49
7	28.957	13150.00	0.08

Для идентификации каждой фракции, представленной на хроматограмме, были изучены УФ-спектры поглощения испытуемого раствора в области определения от 220 нм до 350 нм при временах удерживания, соответствующих максимуму каждой фракции. Данные представлены на Рис. 2.

Анализ хроматограммы, а также данные по временам удерживания БСА, инсулина и фенилаланина показывают, что наиболее интенсивный пик соответствует фракции 5 со временем удерживания 21.6 мин, площадью пика 47.5 % и соответствует свободным аминокислотам, подобным фенилаланину (время удерживания 21.6). УФ-спектр поглощения этой фракции (Рис. 2, кривая 6) имеет максимум при длине волны 255-260 нм (260 нм для фенилаланина), что также указывает на аминокислотную природу фракции 5.

Рисунок 2



**УФ-спектры экстракта фрагментов селезенки свиньи со следующими временами удерживания: 1- 10.683, 2- 13.442, 3- 15.213, 4- 16.909, 5- 18.816, 6- 21.507, 7- 22.849**

Аналогичные выводы можно сделать и для фракции 6 со временем удерживания 22.8 мин, площадью пика 5.5 %. УФ-спектр поглощения этой фракции имеет максимум при длине волны 255-260 нм, соответствующий максимуму УФ-спектра поглощения аминокислот. Возможно, различие между фракциями 5 и 6 заключается в том, что фракция 6 соответствует свободным аминокислотам с низкой молекулярной массой, а фракция 5 - аминокислотам, содержащим ароматические кольца.

Наиболее интересными в препарате являются фракция 4 со временем удерживания 16.9 мин, площадью пика 26.3 %, а также фракция со временем удерживания 15.4 мин. Учитывая, что время удерживания инсулина составляет 14.8 мин, фракцию 4 можно идентифицировать как сумму коротких пептидов с М.м. от 1000 до 3000, а фракцию со временем удерживания 15.4 мин - как более крупные пептиды с М.м. около 4000.

Следует отметить, что фракция коротких пептидов по концентрации (площадь пика) занимает второе место и может, в основном,

определять биологическую активность исследуемого препарата [11].

Следующей значимой по площади пика (18.3 %) фракцией является фракция 3 с большим разбросом времен удерживания (следовательно и М.м.) от 11.7 мин до 15.4 мин. Учитывая, что время удерживания БСА составляет 13.5 мин, а его димера - 10.8 мин, фракцию 3 можно идентифицировать как сумму достаточно крупных белков с М.м. от 15000 до 80000.

Площади пиков фракций 1 и 2 составляют каждая чуть более 1 % от площади всех пиков и, по-видимому, соответствуют высокомолекулярным биологическим полимерам. УФ-спектр поглощения фракции 2 имеет максимум при длине волны 280 нм, что позволяет идентифицировать эту фракцию, как нуклеиновые кислоты.

Таким образом, основными фракциями в препарате являются вещества пептидной природы с различной молекулярной массой и нуклеотиды (Табл. 2).

Таблица 2

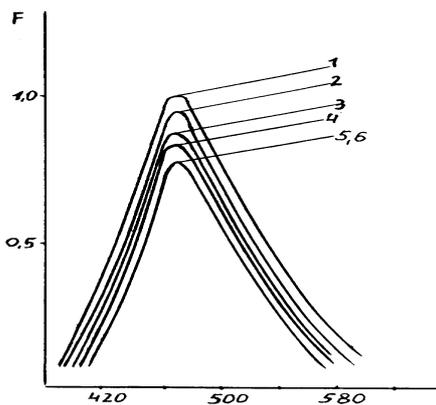
**Состав экстракта криоконсервированных фрагментов селезенки свиньи по данным ВЭПХ**

Природа фракций	Время удерживания, мин	Средняя молекулярная масса	Удельный вес площади пика фракции, %
свободные аминокислоты	более 19	около 165	53
низкомолекулярные пептиды	15.4-19	менее 5000	26
высокомолекулярные пептиды	11.7-15.4	от 5000 до 80000	18
нуклеиновые кислоты	менее 11.7	более 120000	2.3

На Рис. 3 представлены спектры флуоресценции зонда 1,8-АНС в липосомах в присутствии БАВ, экстрагированных из ткани в разное время ее экспозиции в физиологическом растворе (от 15 мин до 1.5 ч). Как видно из рисунка, введение экстракта в раствор с липосомами сопровождается монотонным уменьшением интенсивности флуоресценции зонда в липосомах. Так как изучаемые образцы не поглощают в области возбуждения флуоресценции зонда (при длине волны 365 нм), уменьшение флуоресценции зонда можно объяснить связыванием пептидов экстракта с мембраной липосом, при котором зонд вытесняется молекулами пептидов во внешнюю среду, и происходит тушение флу-

оресценции. При этом диапазон уменьшения флуоресценции зонда DF пропорционален сродству пептидов к липосомам, а, следовательно, и биологической активности этих веществ. Изменение порядка добавления зонда и пептидов в липосомы (введение в раствор с липосомами сначала экстракта, а потом зонда) дало аналогичные величины гашения флуоресценции, что указывает на связывание пептидов с мембраной по конкурентному механизму.

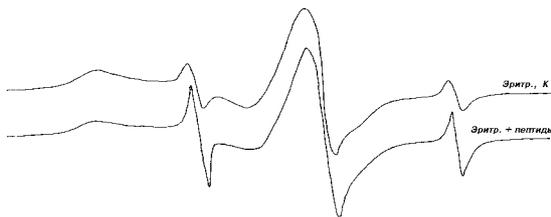
Рисунок 3



Спектры флуоресценции зонда 1,8-АНС в липосомах в присутствии водорастворимых БАВ ткани селезенки при указанном времени экспозиции ткани с экстрагирующим раствором: 1 - контроль; 2 - 0.25 ч; 3 - 0.5 ч; 4 - 0.75 ч; 5 - 1 ч; 6 - 1.5 ч.

На Рис. 4 представлены спектры ЭПР липофильного спинового зонда в мембранах эритроцитов до и после добавления экстракта ткани селезенки.

Рисунок 4



Влияние водорастворимых БАВ ткани селезенки на спектры ЭПР спин-меченого прогестерона в эритроцитах человека

Спектр ЭПР представляет суперпозицию широкого и узкого сигналов ЭПР, соответствующих медленной вращательной диффузии зонда в мембране и быстрой вращательной диффузии зонда во внеклеточной жидкости.

Добавление БАВ приводит к заметным изменениям в спектрах ЭПР - увеличению ин-

тенсивности узкой составляющей спектра вследствие вытеснения зонда из мембраны эритроцитов во внеклеточную жидкость молекулами БАВ. Это свидетельствует об эффективном связывании водорастворимых БАВ ткани с мембранами эритроцитов.

Таким образом, пептиды ткани селезенки эффективно связываются с мембранами липосом и эритроцитов по конкурентному механизму, что позволяет предположить достаточную биологическую активность полученного препарата [11].

**Выводы**

1. Установлено, что общая концентрация пептидов в изучаемом образце ЭКФКС составляет 0.42 мг/мл.

2. Методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии изучено молекулярно-массовое распределение фракций ЭКФКС. Анализ хроматограммы препарата показал, что основными фракциями в препарате являются: фракция свободных аминокислот со временем удерживания более 19 мин (53 %), фракция коротких пептидов со временем удерживания 15.4 мин - 19 мин, М.м. 1000-3000 (26 %), фракция белков со временем удерживания 13.6 мин (18.3%), сопоставимые по приведенным параметрам с БСА, а также нуклеиновые кислоты со временем удерживания менее 11.7 мин, М.м. более 120000 (2.3%).

3. Показано, что пептиды ткани селезенки эффективно связываются с мембранами модельных и интактных клеток по конкурентному механизму, что позволяет предположить высокую биологическую активность полученного препарата.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Суббота Н.П. Перспективы создания нового класса лекарственных соединений на основе фетального сырья // Провизор. -1999.- № 2. - С. 35-36.
2. Береснев А.В., Грищенко В.И., Велигоцкий А.Н. и др. Способ получения и методика применения перфузата криоконсервированных фрагментов селезенки с целью детоксикации и иммунокоррекции. - Методические рекомендации. — Харьков, 1994. - 14 с.
3. Береснев А.В., Сандомирский Б.П., Велигоцкий А.Н. Применение криоконсервированных ксеногепатоцитов в лечении диффузных заболеваний печени, осложнённых холестаазом // Использование физических методов в хирургии: Тез. докл. сетевой науч. - практ. конф. 21-23 мая 1991 года. - Харьков, 1991. - С. 8-9.
4. Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Криоконсервирование адренокортикальной ткани и её использование в клинике // Клінічна фармація. - 1999. - Т. 3, № 2. - С. 112-115.
5. Иванов Л.В. Орлова И.Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов //

В сб. Технология и стандартизация лекарств. - Т. 2. - Харьков, 2000. - С. 558-615.

6. Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Гальченко Е.С. Кробиологические подходы к созданию препаратов из ксеногенного сырья // Лекарства человеку: Материалы науч. - практ. конф. - 2001. - Т. 14, / № 1. - С. 56-57.

7. Дарбре А. Практическая химия белка / Пер. с англ. - М.: Мир, 1989. - С. 293-295.

8. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. - М.: Наука, 1974. - С. 12-24.

9. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980. - 320 с.

10. Липосомы в биологических системах / Под ред. Грегориадиса Г., Аллисона А. - М.: Медицина, 1983. - 384 с.

11. Сергеев В.П. Биохимическая фармакология. - М.: Высшая школа. - 212 с.

#### Резюме

Иванов В.В., Бизов В.В.,  
Сандомирський Б.П., Гальченко С.Є.

#### Деякі біофармацевтичні властивості екстракту кріоконсервованих фрагментів ксеноселезінки

Методом високоефективної гель-проникної хроматографії вивчено молекулярно-масовий розподіл фракцій екстракту кріоконсервованих фрагментів свиної селезінки. Встановлено, що основними складовими екстракту є речовини пептидної природи і нуклеотиди. За допомогою методів спинових і флуоресцентних зондів показано, що пептидна фракція екстракту ефективно зв'язується з мембранами модельних та інтактних клітин.

#### Summary

Ivanov L.V., Byzov V.V.,  
Sandomirsky B.P., Galchenko S.E.

#### Some biopharmaceutical properties of xenospleen cryopreserved extracts

The chain-length distribution of the swine spleen cryopreserved fractions was studied by high-performance gel-penetrating chromatography method. It was established that the main extract components are the substances of peptide nature and nucleotides. Using the methods of spin and fluorescent probes it was shown that peptide fraction of extract is bounded effectively with model and intact cell membranes.

**Иванов Леонид Викторович** (р. 1947). Окончил Харьковский государственный университет. Канд. хим. наук (1979). Работает в ГНЦЛС (с 1983). Ст. науч. сотрудник лаборатории экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики (ЛЭФБТ).

**Бизов Владимир Викторович** (р. 1961). Окончил Харьковский медицинский институт. Зав. торакально-хирургическим отделением № 2 городской клинической больницы № 13.

**Сандомирский Борис Петрович** (р. 1938). Доктор мед. наук. Профессор. Зав. отделением экспериментальной криомедицины Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

**Гальченко Сергей Евгеньевич** (р. 1953). Окончил радиофизический факультет Харьковского государственного университета по специальности «биофизика». Канд. биол. наук. Ст. науч. сотрудник отдела экспериментальной криомедицины Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

## Стандартизація лікарських засобів

УДК 615.324:665.214].07

Котова Э.Э., Зинченко А.А., Куликов А.Ю., Котов А.Г., Хованская Н.П., Дячок В.В.

ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

АО «Галичфарм», г. Львов

### К вопросу о методах стандартизации рыбьего жира. Определение жирнокислотного состава и количественного содержания витамина D<sub>3</sub> в рыбьем жире

Изучена возможность количественного определения витамина D<sub>3</sub> в рыбьем жире методом жидкостной хроматографии с использованием одной колонки; подобраны условия обращенно-фазового хроматографирования и регенерации колонки. Разработана методика определения количественного содержания витамина D<sub>3</sub> в рыбьем жире. Предложенная методика позволяет существенно сократить время анализа, не требует применения специального дорогостоящего оборудования. Метрологические характеристики обеспечивают необходимую степень точности методики. Выбраны условия определения жирных кислот в рыбьем жире методом газовой хроматографии, приведено нормирование критериев пригодности хроматографической системы, предложена методика перэтерификации жирных кислот. Разработана методика идентификации и количественного определения жирных кислот в рыбьем жире. Предложенная методика позволяет с высокой надежностью определять жирнокислотный состав препарата и существенно сократить время анализа.

Рыбий жир получают из печени тресковых рыб: трески атлантической — (*Gadus morhua* L.), трески балтийской (*Gadus morhua callarias* L.), пикши (*Melanogrammus aeglefinus* L.), путассу северной (*Micromesistius poutassou*: Risso) семейства тресковых Gadidae [1].

Во врачебной практике рыбий жир используют для профилактики и лечения гиповитаминоза А, рахита, как общеукрепляющее средство, для ускорения сращения костных переломов и при других показаниях к применению витаминов группы А и D [1,2].

Препараты рыбьего жира содержат витамины групп А и D. Кроме того в составе рыбьего жира в значительном количестве содержатся полиненасыщенные жирные кислоты, которые вносят определенный вклад в биологическое действие препарата. Так, докозагексаеновая кислота (ДГК) необходима для нормального развития мозга, нервной системы и сетчатки глаза, эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) является предшественником биологически активных молекул-эйкозанидов (лейкотриенов и простагландинов) [3]. В связи с этим современные показания к применению препарата значительно расширены: гиперлипидемия, профилактика атеросклероза и тромбозов (в т.ч. тромбоза коронарных путей у пациентов с нарушениями реологических свойств крови) и др. [3].

Монографии на рыбий жир включены практически во все ведущие Фармакопеи. В

Украине рыбий жир выпускается в соответствии с требованиями ФС 42-2772-91. В Табл. 1 приведены требования к качеству рыбьего жира по основным показателям (идентификация, жирнокислотный состав, количественное определение), включенные в монографии Европейской Фармакопеи, Британской Фармакопеи, Фармакопеи США, Фармакопеи Японии, а также в ФС 42-2772-91.

Как видно из Табл. 1, методы стандартизации препарата в вышеперечисленных документах различны. Регламентируются, во-первых, различные действующие вещества рыбьего жира, а, во-вторых, различные пределы их количественного содержания.

Так, если витамин А контролируется и регламентируется во всех указанных документах, то по контролю витаминов группы D не существует единого подхода.

В Фармакопее США предложен биологический метод определения содержания витамина D<sub>3</sub>, который представляет собой изучение биологического действия препарата по сравнению с биологическим действием стандартного образца холекальциферола на группе животных, содержащихся определенной время на рахитогенной диете. Содержание витамина D<sub>3</sub> в препарате регламентируется не менее 85 МЕ/г. Данный метод достаточно трудоемкий и длительный.

В ФС 42-2772-91 «Жир рыбий очищенный для внутреннего применения» контролирует-

Таблица 1

## Требования к качеству рыбьего жира по некоторым основным показателям в различных нормативных документах

Показатель	ЕФ 98, ВР 98	ФС 42-2772-91	USP 24, с. 461	JP XIII, с. 765
Идентификация	<p>1. <b>Витамин А.</b> УФ-спектр поглощения испытуемого раствора должен иметь максимум при длине волны (325±2) нм (метод А). На хроматограмме испытуемого раствора должен обнаруживаться пик, время удерживания которого совпадает со временем удерживания пика ретинола на хроматограмме раствора СО ретинола (метод Б).</p> <p>2. <b>Витамин D<sub>3</sub>.</b> На хроматограмме испытуемого раствора, должен обнаруживаться пик, время удерживания которого совпадает со временем удерживания пика холекальциферола на хроматограмме раствора СО холекальциферола.</p> <p>3. <b>Жирнокислотный состав.</b> На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться пики метиловых эфиров пятнадцати жирных кислот: миристиновой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, олеиновой, цис-вакценовой, линолевой, линоленовой, мороктиновой, гадолеиновой, гондоевой, эйкозапентаеновой, цетолеиновой, эруковой и докозагексаеновой.</p> <p>4. Цветная реакция с раствором хлорида сурьмы.</p>	<p>1. Цветная реакция с раствором хлорида сурьмы.</p> <p>2. Раствор препарата в хлороформе с концентрированной серной кислотой дает синевфиолетовое окрашивание, переходящее в бурое.</p>	Цветная реакция с раствором хлорида сурьмы.	Цветная реакция с раствором хлорида сурьмы.
Жирнокислотный состав	Содержание жирных кислот в препарате, <i>в процентах</i> , должно быть: миристиновой - от 2.0 до 6.0; пальмитиновой - от 7.0 до 14.0; пальмитолеиновой - от 4.5 до 11.5; стеариновой - от 1.0 до 4.0; олеиновой - от 12.0 до 21.0; цис-вакценовой - от 2.0 до 7.0 линолевой - от 0.5 до 3.0; линоленовой - не более 2.0; мороктиновой - от 0.5 до 4.5; гадолеиновой - от 1.0 до 5.5; гондоевой - от 5.0 до 17.0; эйкозапентаеновой - от 7.0 до 16.0; цетолеиновой - от 5.0 до 12.0; эруковой - не более 1.5; докозагексаеновой от 6.0 до 18.0.	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Количественное определение	<p><b>Витамин А</b> <i>Метод А.</i> Спектрофотометрия после омыления при длинах волн 300 нм, 310 нм, 325 нм и 334 нм. <i>Метод В.</i> ВЭЖХ. Содержание витамина А в 1 г препарата должно быть от 600 МЕ до 2500 МЕ.</p> <p><b>Витамин D<sub>3</sub></b> ВЭЖХ. Содержание витамина D<sub>3</sub> в 1 г препарата должно быть от 60 МЕ до 250 МЕ.</p>	<p><b>Витамин А</b> Спектрофотометрическое определение комплекса витамина А с хлоридом сурьмы. Содержание витамина А в 1 г препарата должно быть от 350 МЕ до 1000 МЕ.</p> <p><b>Витамин D<sub>2</sub></b> Спектрофотометрическое определение комплекса эргокальциферола, выделенного с ТСХ-пластинки, с хлоридом сурьмы. Содержание витамина D<sub>2</sub> в 1 г препарата должно быть от 50 МЕ до 100 МЕ.</p>	<p><b>Витамин А</b> Спектрофотометрия при длинах волн 310 нм, 325 нм и 334 нм. Содержание витамина А в 1 г препарата должно быть не менее 850 МЕ/г.</p> <p><b>Витамин D<sub>3</sub></b> Биологический метод. Содержание витамина D<sub>3</sub> в 1 г препарата должно быть не менее 85 МЕ.</p>	<p><b>Витамин А</b> Спектрофотометрия при длинах волн 310 нм, 325 нм и 334 нм. Содержание витамина А в 1 г препарата должно быть от 2000 МЕ до 5000 МЕ.</p>

ся и нормируется содержание эргокальциферола (витамина D<sub>2</sub>) от 50 МЕ/г до 100 МЕ/г.

Методика, приведенная в ФС 42-2772-91, основана на получении неомыляемого остатка препарата, осаждении из него стеринам раствором дигитонина, выделении эргокальциферола методом тонкослойной хроматографии и дальнейшем спектрофотометрическом определении образующегося комплекса эргокальциферола с раствором хлорида сурьмы. Недостатком данной методики является нечеткое разделение на хроматограмме зоны эргокальциферола от других компонентов неомыляемого остатка препарата, а также использование неселективной реакции для спектрофотометрического определения: в реакцию с хлоридом сурьмы вступают также такие компоненты неомыляемого остатка, как каротиноиды, витамин А, простагландины и т.п. Кроме того, данная реакция нестабильна во времени.

В Европейской Фармакопее регламентируется содержание холекальциферола (витамина D<sub>3</sub>) от 60 МЕ/г до 250 МЕ/г. Методика определения количественного содержания холекальциферола так же основана на выделении неомыляемого остатка препарата. Последующее определение проводят методом жидкостной хроматографии в два этапа. Сначала хроматографирование проводят на колонке, заполненной силикагелем с привитыми нитрильными группами, и выделяют из неомыляемого остатка фракцию, содержащую, в основном, витамины группы D. Затем выделенную фракцию хроматографируют на колонке, заполненной силикагелем с привитыми C<sub>18</sub> группами, и методом внутреннего стандарта определяют содержание холекальциферола в препарате. Данная методика позволяет надежно определять содержание холекальциферола в препарате, однако она очень длительна и трудоемка, и для ее воспроизведения необходим либо препаративный жидкостный хроматограф, либо, как минимум, два хроматографа.

По показателю «Жирнокислотный состав», как видно из Табл. 1, препарат контролируется только в Европейской и Британской Фармакопеех, несмотря на очевидное важное биологическое значение полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав рыбьего жира. Важность данного показателя обусловлена тем, что он характеризует, прежде всего, подлинность препарата, а также позволяет определить наличие в препара-

те других жиров. Методика определения жирнокислотного состава препарата в этих монографиях основана на получении летучих эфиров жирных кислот и дальнейшем их разделении методом газовой хроматографии (ГХ). При этом регламентируются пределы содержания в препарате 15 жирных кислот. Методика весьма трудоемка, предусматривает сложную пробоподготовку.

Целью данной работы являлось изучение возможности разработки более простых методик, позволяющих достоверно контролировать качество рыбьего жира по жирнокислотному составу и количественному содержанию витамина D<sub>3</sub>.

### *Экспериментальная часть*

В качестве объектов исследований нами были взяты 5 образцов рыбьего жира различных производителей (Табл. 2).

В работе использовали реактивы и растворители ведущих фирм-производителей ("Fluka", Германия, "Merck", Германия), квалификации «х.ч.» и «для хроматографии».

В качестве стандартных образцов использовали EP CRS холекальциферола и EP CRS эргокальциферола.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе «Hewlett Packard» HP-1050, снабженном спектрофотометрическим детектором, с использованием колонки Symmetry C18, размером 0.15 м × 4.6 мм, и на газовом хроматографе «Shimadzu GC 14» с пламенно-ионизационным детектором, с использованием колонки капиллярной кварцевой, размером 60 м × 0.32 мм, с неподвижной фазой: цианопропил-метилсилоксан (1:1).

### Витамин D<sub>3</sub>

Предлагаемая нами методика определения витамина D<sub>3</sub> в рыбьем жире, так же как и методика Европейской Фармакопее, основана на выделении неомыляемых веществ препарата и последующем хроматографическом разделении компонентов неомыляемого остатка на жидкостном хроматографе. Так как витамины группы D достаточно чувствительны к воздействию света, кислорода воздуха и других факторов [4], при разработке методики количественного содержания витамина D<sub>3</sub> немаловажным фактором стало сокращение времени анализа.

В результате многочисленных экспериментов по разделению компонентов неомыляемого остатка препарата, а также модельных смесей витамина D<sub>3</sub> с холестерином, яв-

Таблица 2

## Сравнение жирнокислотного состава различных образцов рыбьего жира

Жирная кислота	Рыбий жир (Галичфарм, Львов)	Рыбий жир (Россия, Тверь, с.022000)	Рыбий жир (Венгрия)	Рыбий жир (Индия)	Рыбий жир (Nabras, с. 814, Индия)	Пределы содержания (ЕФ, 3-е изд.)
Миристиновая С 14:0	5.67%	3.15%	8.45%	2.4%	3.18%	2-6%
Пальмитиновая С 16:0	15.08 %	12.19%	16.93%	11.83%	10.50%	7-14%
Пальмитоолеиновая С 16:1 n-9	6.43%	10.04%	9.98%	4.86%	5.04%	4.5-11%
Стеариновая С 18:0	2.79%	2.34%	2.94%	2.89%	2.19%	1-4%
Олеиновая С 18:1 n-9	17.39%	19.39%	9.34%	18.76%	17.41%	12-21%
Цис-вакценовая С 18:1 n-11	2.89%	5.72%	2.87%	2.62%	3.89%	2-7%
Линолевая С 18:2 n-9,12	7.19%	2.2%	2.34%	29.08%	4.84%	0.5-3%
Линоленовая С 18:3 n-9,12,15	2.06%	0.94%	0.8%	1.04%	1.00%	0-2%
Морокиновая С 18:4 n-6,9,12,15	2.32%	2.93%	2.62%	2.1%	2.46%	0.5-4.5%
Гадолеиновая С 20:1 n-9	1.24%	0.5%	0.8	0.44%	0.2%	1.0-5.5%
Гондоевая С 20:1 n-11	5.89%	13.66%		5.41%	11.02%	5-17%
Эйкозапентаеновая С 20:5n-5,8,11,14,17	9.57%	10.21%	19.93%	6.29%	8.91%	7-16%
Цетолеиновая С 22:1 n-9	5.03%	6.88%		3.59%	9.32%	5-12%
Эруковая С 22:1 n-13	0.67%	0.89%		0.39%	0.47%	0-1.5%
Докозагексаеновая С 22:6 n-4,7,10,13,16,19	9.65%	11.66%	9.89%	5.99%	12.05%	6-18%

ляющим основным компонентом неомыляемого остатка, на различных типах колонок нами были разработаны условия хроматографирования, позволяющие отделять холекальциферол непосредственно из неомыляемого остатка препарата с использованием одной колонки в режиме градиентного элюирования.

При этом до выхода пика холекальциферола хроматографирование проводится в изократическом режиме с использованием подвижной фазы ацетонитрил-вода (90:10). После выхода пика холекальциферола применяется двойной градиент подвижной фазы: изменяется и состав (переход на чистый ацетонитрил), и скорость подвижной фазы.

Выбранные условия элюирования позволяют не только надежно отделить холекальциферол, но и за оптимальное время вымыть из колонки остальные компоненты неомыляемого остатка. Так как анализируемая проба имеет сложный компонентный состав, часть которого может оставаться на хроматографической колонке, нами разработаны дополнительные условия по промыванию колонки после каждого двадцатого ввода. Промывание колонки предлагаем проводить смесью равных объемов тетрагидрофурана, ацетонитрила и метанола.

Идентификацию пика холекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора проводили по совпадению его времени удерживания со временем удерживания пика холекальциферола на хроматограмме раствора СО холекальциферола, а также по увеличению площади соответствующего пика на хроматограмме испытуемого раствора, в который предварительно вносили добавки раствора СО холекальциферола.

Для получения достоверных и воспроизводимых результатов нами были разработаны условия проверки пригодности хроматографической системы.

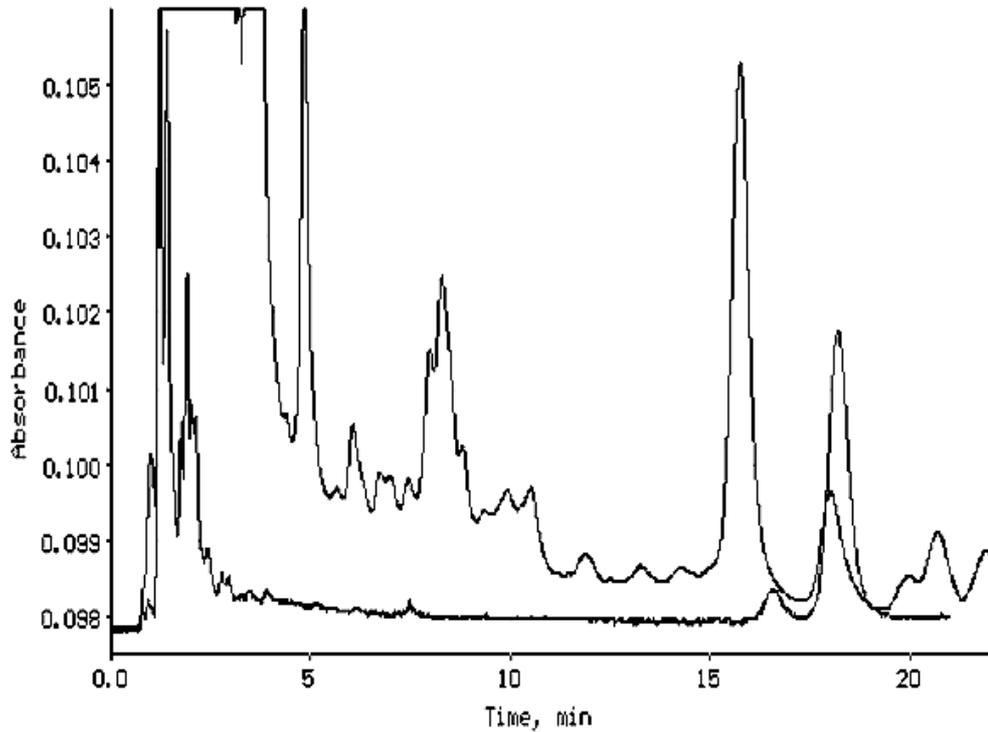
Для проверки пригодности хроматографической системы предлагаем использовать специально приготовленный раствор, состоящий из равных количеств эргокальциферола и холекальциферола с концентрациями, близкими к концентрации холекальциферола в испытуемом растворе. Из хроматограмм данного раствора регламентируется время удерживания пика холекальциферола и предлагаются условия корректировки состава подвижной фазы для достижения указанного времени удерживания, а также степень разделения пиков эргокальциферола и холекальциферола.

Разработаны также требования к пригодности хроматографической системы, обеспечивающие точность и воспроизводимость количественного определения: эффективность хроматографической колонки, относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика холекальциферола, коэффициент асимметрии пика, рассчитанный

для пика холекальциферола. Данные параметры предлагаем контролировать из хроматограмм раствора СО холекальциферола.

Перечисленный набор требований позволяет стандартизовать хроматографические условия и определять количественное содержание витамина D<sub>3</sub> с достаточной степенью

Рисунок 1



Хроматограммы СО холекальциферола (внизу) и испытуемого раствора (вверху), полученные в условиях количественного определения витамина D<sub>3</sub>

Таблица 3

Метрологические характеристики среднего результата определения количественного содержания витамина D<sub>3</sub>

X <sub>i</sub>	f	$\bar{X}_{cp}$	S <sup>2</sup>	S	S <sub>x cp</sub>	P, %	t(P,f)	Δx	Δx <sub>cp</sub>	ε <sub>cp</sub>
107.5										
104.7	3	108.7	12.096	3.478	1.739	95	3.182	11.067	5.533	5.089
109.8										
112.9										

Таблица 4

Результаты определения количественного содержания витамина D<sub>3</sub> методом введено-найдено

X <sub>i</sub>	f	μ	$\bar{X}_{cp}$	S <sup>2</sup>	S	P, %	t(P,f)	Δx	ε, %
112.30									
108.70	3	112	110.02	12.86	3.59	95	3.18	11.41	10.37
105.6									
113.50									

точности (метрологические характеристики приведены в Табл. 3).

Воспроизводимость и правильность разработанной методики проверяли методом добавок известного содержания холекальциферола к препарату; результаты определения (метод введено-найдено) приведены в Табл. 4. Как видно из таблицы, отсутствие систематической ошибки свидетельствует о правильности методики.

На Рис.1 представлены хроматограммы раствора СО холекальциферола и испытуемого раствора, полученные в указанных условиях количественного определения витамина D<sub>3</sub>.

#### Методика количественного определения витамина D<sub>3</sub>

4.00 г рыбьего жира помещают в круглодонную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора кислоты аскорбиновой, 10 мл 80 % раствора кали едкого и 100 мл спирта этилового 96 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. К еще горячему раствору прибавляют 100 мл 1 % раствора натрия хлорида и охлаждают до комнатной температуры. Содержимое колбы количественно, с помощью 75 мл 1 % раствора натрия хлорида, переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, прибавляют 150 мл смеси равных объемов петролейного эфира с температурой кипения от 40 °С до 80 °С и диэтилового эфира и встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения слоев нижний слой отбрасывают, а верхний, эфирный слой, промывают сначала 50 мл 3 % раствора кали едкого в смеси вода-спирт (9:1), а затем трижды 1 % раствором натрия хлорида, каждый раз порциями по 50 мл. Промытый эфирный слой фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», содержащий 5 г безводного натрия сульфата, в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Делительную воронку промывают 10 мл вышеописанной смеси эфиров и фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. Осторожно удаляют растворитель под вакуумом при температуре не выше 30 °С почти досуха, затем удаляют растворитель досуха в токе азота. Остаток растворяют в 1.0 мл спирта изопропилового. В случае образования нерастворимого осадка, осторожно обрабатывают раствор ультразвуком в течение 1 мин при температуре, не превышающей 30 °С (испытуемый раствор).

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора СО холекальциферола попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка Symmetry C18, размером 0.15 м × 4.6 мм, с размером частиц 5 мкм, или аналогичная, для которой выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы»;

- подвижная фаза А – ацетонитрил - вода (90:10), дегазированная любым удобным способом;

- градиентное элюирование:

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Ацетонитрил, %	Скорость подвижной фазы, мл/мин
0	100	0	1.0
22	100	0	1.0
22.1	0	100	1.5
38	0	100	1.5
38.1	100	0	1.0
45	100	0	1.0

- температура колонки 50 °С;

- длина волны детектирования - 265 нм.

После каждого 20 анализа промывают колонку смесью равных объемов тетрагидрофурана, ацетонитрила и метанола в течение 20 мин со скоростью 1.0 мл/мин.

Содержание витамина D<sub>3</sub> (X), в 1 грамме препарата, в международных единицах (МЕ), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 1 \cdot P \cdot 40000}{S_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 40}{S_0 \cdot m \cdot 125},$$

где:

S<sub>1</sub> - среднее значение площадей пиков холекальциферола, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S<sub>0</sub> - среднее значение площадей пиков холекальциферола, вычисленное из хроматограмм раствора СО холекальциферола;

P - содержание холекальциферола в СО холекальциферола, в процентах;

m<sub>0</sub> - масса навески СО холекальциферола, в миллиграммах;

m - масса навески препарата, взятая для приготовления испытуемого раствора, в граммах.

1 мг холекальциферола соответствует 40000 МЕ.

#### Жирнокислотный состав

Предлагаемая нами методика определения жирнокислотного состава препарата, так же

как и методика Европейской Фармакопеи, основана на получении летучих эфиров жирных кислот и дальнейшем их разделении методом ГХ, как наиболее эффективным методом разделения сложных смесей природных жирных кислот [5].

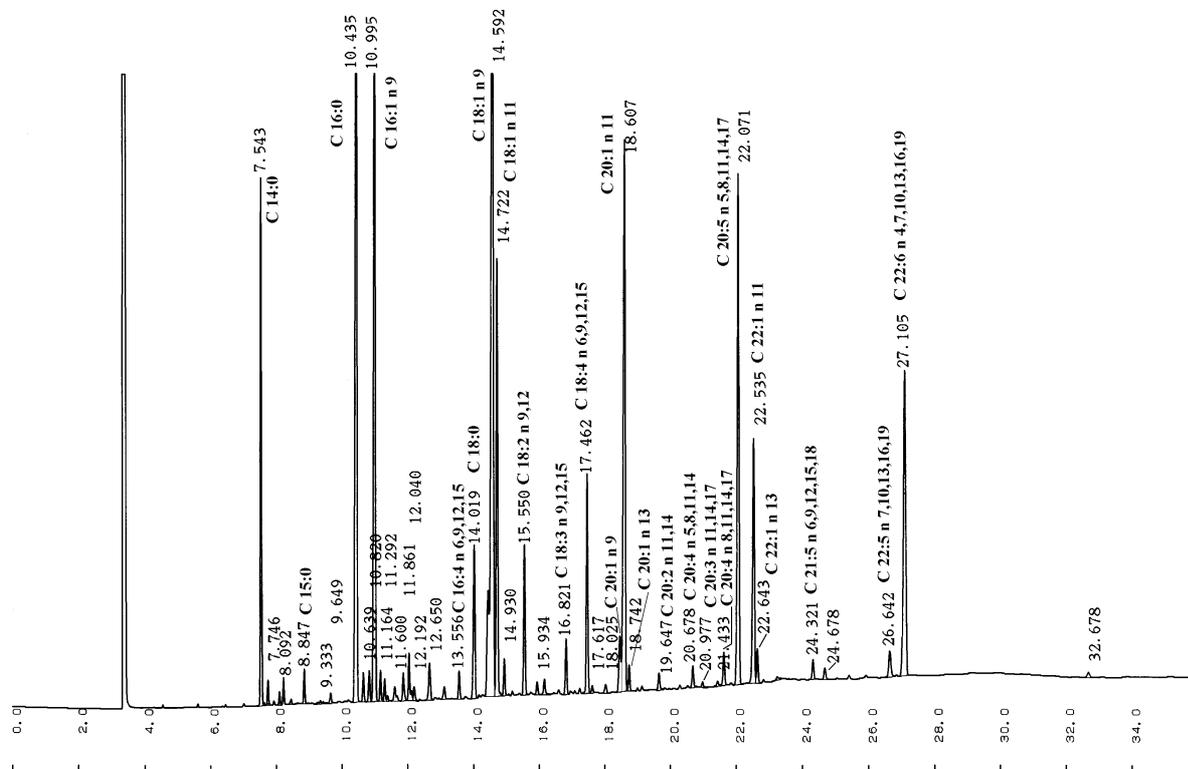
Существует несколько способов получения летучих производных жирных кислот, из которых наиболее распространенным является переэтерификация триглицеридов жирных кислот в их метиловые эфиры. Методика получения метиловых эфиров жирных кислот описана в работе [6], и ее модификации ранее использовались нами для определения жирнокислотного состава в других медицинских маслах, таких как масло облепиховое, масло тыквы и др.

В отличие от методики, описанной в Европейской Фармакопее, где для получения метиловых эфиров используется щелочной катализатор - метилат натрия, в разработанной нами методике переэтерификацию предлагается проводить в среде метанола в присутствии кислотного катализатора, использование которого обеспечивает полноту метилирования связанных жирных кислот рыбьего жира (Рис. 2). Кроме того, получение катали-

затора осуществляется непосредственно в реакционной смеси прибавлением хлористого ацетила к метанольному раствору рыбьего жира. Такой подход позволяет исключить стадию экстрагирования продуктов реакции и тем самым снизить возможные потери. При этом сокращается также время пробоподготовки и анализа в целом.

Разделение полученных метиловых эфиров жирных кислот предлагаем проводить методом ГХ на капиллярной колонке с высокополярной кремнийорганической нитрильной неподвижной фазой, специально предназначенной для разделения метиловых эфиров различных жирных кислот, в том числе цис- и трансизомеров. Использование этой колонки обеспечивает практически полное разделение всех основных пиков метиловых эфиров жирных кислот рыбьего жира. Кремнийорганическая нитрильная неподвижная фаза при выбранной температуре хроматографирования является более устойчивой, чем фаза (ПЭО 20М), используемая в методике Европейской Фармакопеи, поэтому такая замена существенно продлевает срок службы колонки с одновременным сокращением времени анализа с 60 мин до 35 мин.

Рисунок 2



Типичная хроматограмма, полученная в условиях определения жирнокислотного состава рыбьего жира

В качестве критерия пригодности хроматографической системы предлагаем регламентировать степень разделения пиков критической пары: метиловый эфир олеиновой кислоты – метиловый эфир цис-вакценовой кислоты, которая должна быть не менее 1.3. При этом необходимость в использовании дорогостоящих стандартных образцов метиловых эфиров жирных кислот, предусмотренных методикой Европейской Фармакопеи, становится не актуальной.

Поскольку количество пиков метиловых эфиров жирных кислот на получаемых хроматограммах может превышать 50, считаем целесообразным в качестве информационного материала и для идентификации пиков привести типичную хроматограмму жирнокислотного состава с указанием индексации жирных кислот (Рис. 2).

Названия и индексация жирных кислот нами предложены в соответствии с правилами Женевской номенклатуры. При этом указывается количество углеродных атомов в цепи жирной кислоты, затем количество двойных связей и положение двойной связи, т.е. номер атома (или атомов) углерода при котором находится двойная связь. Нумерация атомов углерода начинается от карбоксильной группы. Следует отметить, что в монографии Европейской Фармакопеи на рыбий жир приведена иная нумерация атомов углерода, по которой отсчет начинается от конечной метиленовой группы. Мы считаем более целесообразным использовать Женевские правила индексации жирных кислот.

Расчет содержания жирных кислот в препарате предлагаем проводить методом внутренней нормализации. Содержание жирных кислот в рыбьем жире регламентируем в точном соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи. Пределы содержания жирных кислот и данные, полученные при определении жирнокислотного состава различных образцов рыбьего жира по разработанной методике, приведены в Табл. 2.

Как видно из приведенных данных, исследуемые образцы значительно отличаются друг от друга по жирнокислотному составу, и лишь немногие удовлетворяют требованиям Европейской Фармакопеи. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что в трех образцах завышено содержание линолевой кислоты (особенно в рыбьем жире производства индийской фирмы, где содержание линолевой кислоты в 10 раз превышает максимально допустимое, а содержание ЭПК и ДГК

ниже нижнего предела). Это, вероятнее всего, объясняется тем, что препарат разбавлен растительным маслом, в составе жирных кислот которого преобладает линолевая кислота.

Полученные данные подтверждают очевидную необходимость контроля качества рыбьего жира по показателю «Жирнокислотный состав», что позволит установить фальсифицированные образцы.

#### Методика определения жирнокислотного состава

0.05 г рыбьего жира помещают в остродонную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 0.5 мл эфира, 5 мл спирта метилового, 0.05 мл ацетила хлористого и перемешивают. Колбу с полученной смесью присоединяют к обратному холодильнику, продувают инертным газом и нагревают на глицериновой бане при температуре  $(65 \pm 3)^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. Затем раствор выпаривают в токе инертного газа до остаточного объема около 0.5 мл и охлаждают до комнатной температуры. Прибавляют 2 мл циклогексана, 1 мл воды, взбалтывают в течение 1 мин и выдерживают до полного разделения слоев. Верхний, циклогексановый слой, отделяют и фильтруют через 0.2 г натрия сульфата безводного (испытываемый раствор).

2.0 мкл испытуемого раствора хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 2 хроматограмм, в следующих условиях:

- колонка капиллярная кварцевая, размером  $60 \text{ м} \times 0.32 \text{ мм}$ , с неподвижной фазой 50 % цианопропил-50 % метилсилоксан, толщина слоя 0.25 мкм;
- температуру колонки программируют: температуру  $160^\circ\text{C}$  выдерживают в течение 2 мин, затем повышают температуру со скоростью  $3^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $225^\circ\text{C}$  и выдерживают в течение 15 мин;
- температура испарителя -  $240^\circ\text{C}$ ;
- температура детектора -  $250^\circ\text{C}$ ;
- скорость газа-носителя (водород, гелий) - 1.0 мл/мин;
- деление потока газа-носителя - 1:70.

Содержание каждой кислоты в препарате (X), в процентах от суммарного содержания жирных кислот, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_i * 100}{\sum_{i=1}^n S_i},$$

где:

$S_i$  – среднее значение площадей пиков метилового эфира соответствующей жирной кислоты, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$\Sigma S_i$  – среднее значение суммы площадей всех пиков метиловых эфиров жирных кислот, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

### Выводы

1. Изучена возможность количественного определения витамина  $D_3$  в рыбьем жире методом жидкостной хроматографии с использованием одной колонки, подобраны условия обращенно-фазового хроматографирования и регенерации колонки. Разработана методика определения количественного содержания витамина  $D_3$  в рыбьем жире. Предложенная методика позволяет существенно сократить время анализа по сравнению со всеми перечисленными выше методиками, не требует применения специального дорогостоящего оборудования. Метрологические характеристики методики обеспечивают необходимую степень точности определения.

2. На основании проведенных исследований выбраны условия определения жирных кислот в рыбьем жире методом газовой хроматографии и нормирования критериев пригодности хроматографической системы; предложена методика переэтерификации жирных кислот. Разработана методика идентификации и количественного определения содержания жирных кислот в рыбьем жире. Предложенная методика позволяет с высокой надежностью определять жирнокислотный состав препарата, существенно сократить время анализа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д., Лекарственные средства. - 13-е изд., новое. - Харьков: Торсинг, 1997. - Т. 1-2.
2. РЛС- Энциклопедия лекарств. - 8-е изд. - М.: РЛС-2000, 2001. - с. 771.
3. Фарминдекс' 98- лекарственные препараты. - Киев: НПП "Морион LTD", 1998. - с. 744.
4. Хроматография. Практическое приложение метода / Ред. Э. Хефтман. - М.: Мир, 1986. - Т. 1. - 336 с.
5. В. Дженнингс, А. Рапп. Подготовка образцов для газохроматографического анализа. - М.: Мир, 1986. - 116 с.
6. А.А. Лурье. Хроматографические материалы. - М.: Химия, 1978. - 438 с.

### Резюме

Котова Е.Е., Зінченко О.А., Куліков А.Ю., Котов А.Г., Хованська Н.П., Дячок В.В.

**До питання про методи стандартизації риб'ячого жиру. Визначення жирнокислотного складу і кількісного вмісту вітаміну  $D_3$  у риб'ячому жирі**

Вивчена можливість кількісного визначення вітаміну  $D_3$  у риб'ячому жирі методом рідинної хроматографії

з використанням однієї колонки, підібрані умови обернено-фазового хроматографування і регенерації колонки. Розроблена методика визначення кількісного вмісту вітаміну  $D_3$  у риб'ячому жирі. Запропонована методика дозволяє істотно скоротити час аналізу, не потребує застосування спеціального обладнання, що дорого коштує. Метрологічні характеристики забезпечують необхідний ступінь точності методики. Вибрані умови визначення жирних кислот у риб'ячому жирі методом газової хроматографії, приведено нормування критеріїв придатності хроматографічної системи, запропонована методика переетерифікації жирних кислот. Розроблена методика ідентифікації і кількісного визначення жирних кислот у риб'ячому жирі, яка дозволяє з високою надійністю визначати жирнокислотний склад препарату та істотно скоротити час аналізу.

### Summary

Kotova E.E., Zinchenko A.A., Kulikov A.U., Kotov A.G., Khovanskaya N.P., Diachok V.V.

### On the matter of cod-liver oil standardization method

The possibility of quantitative vitamin  $D_3$  determination in cod-liver oil by one column liquid chromatography method was studied and the reverse-phase chromatography conditions were selected. The method of quantitative determination of vitamin  $D_3$  in cod-liver oil was developed. An offered method allows to diminish essentially the time of analysis and does not need in application of special expensive equipment. Metrological behavior of the method provides for necessary degree of accuracy. The conditions of fat acids determination in cod-liver oil by gas chromatography method were selected, the system suitability criteria regulation was given and the method of interesterification of fat acids was suggested. The method of identification and quantitative determination of fat acids in cod-liver oil was developed. The offered method allows to determine a fatty-acid composition of medicine with high reliability and to diminish essentially the time of analysis.

**Котова Элина Эдуардовна.** Окончила Харьковский университет (1983). Мл. науч. сотрудник лаборатории фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1992).

**Зинченко Александр Анатольевич** (р. 1956). Окончил Харьковский университет (1983). Ст. науч. сотрудник лаборатории фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1992).

**Куликов Артем Юрьевич** (р. 1971). Окончил Харьковский университет (1996). Ст. науч. сотрудник лаборатории фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1998). Канд. хим. наук (1997).

**Котов Андрей Георгиевич** (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ст. науч. сотрудник сектора ПСГ ГНЦЛС (2001). Канд. фарм. наук (1996).

**Хованская Наталья Петровна.** Окончила Харьковский университет (1970). Зав. лабораторией фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (1992). Канд. фарм. наук (1992).

**Дячок Василий Владимирович** (р.1963). Окончил Львовский политехнический институт (1986). Канд. тех наук (1994). Директор по науке АО «Галичфарм» (1999).

УДК 615.07:615.322

Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Ковальов В.М., Комісаренко А.М., Тимченко М.М.  
Національна фармацевтична академія України  
Державний науковий центр лікарських засобів, м. Харків  
Дослідний завод ДНЦЛЗ

## Розробка методів стандартизації нового лікарського засобу піфламін

Розроблені методи стандартизації нового лікарського засобу піфламін — сухого екстракту, одержаного із трави *Pisum sativum* L.. Наведено обґрунтування основних методів аналізу піфламіну.

На основі сумарного комплексу біологічно активних сполук із трави гороху посівного *Pisum sativum* L. (родина Fabaceae), що містить поліфенольні сполуки, амінокислоти, цукри, мікроелементи, нами був одержаний сухий екстракт піфламін, який виявляє гепатопротекторну дію. Розроблена схема технологічного процесу виробництва піфламіну, яка складається з вальцювання сировини (надземної частини гороху), її подрібнення, екстракції сировини 50 % етанолом, знежирення хлороформом, упарювання до сухого залишку [4, 8, 11, 12].

У центральній науково-дослідній лабораторії (ЦНДЛ) НФАУ під керівництвом проф. Л.В. Яковлевої виявлена антиоксидантна і гепатопротекторна ефективність препарату. За результатами проведених досліджень встановлено, що субстанція піфламін є високо-ефективним антиоксидантом, який не роз'єднує процеси окислення та фосфорилування мітохондрій печінки щурів у системі *in vitro*. На моделях гострих токсичних гепатитів, а також на моделі хронічного гепатиту у щурів піфламін у дозі 100 мг/кг (умовно терапевтична) виявляє гепатопротекторну дію на рівні стандартного препарату силібор.

Піфламін сприяє зниженню загальної кислотності шлункового соку, що слід урахувати при його застосуванні у людей зі зниженою кислотністю; у об'єктів дослідження не виявлено ульцерогенної дії. Піфламін є відносно нешкідливим і при тривалому введенні не чинить вираженого токсичного впливу на організм експериментальних тварин; не виявляє мутагенної, алергізуючої, імуноотоксичної, місцевої подразнюючої, гонадотоксичної, ембріотоксичної та кумулятивної дії. Результати фармакологічних та токсикологічних досліджень піфламіну дозволяють рекомендувати його для застосування в медичній практиці як гепатопротектора [1, 3, 5, 6, 13].

Раніше нами був розроблений спосіб одержання очищеного комплексу біологічно ак-

тивних речовин (БАР), який виявляє гіпоглікемічну активність. Для піфламіну також установлені помірно виражені гіпоглікемічні властивості, які дозволяють рекомендувати його не як самостійний гіпоглікемічний засіб, а у комплексі з ефективними цукрознижуючими препаратами або інсулінотерапією [9].

Нами встановлено виражену інгібуючу дію піфламіну на ферментативну активність ліпази і фосфоліпази, що є однією з ділянок механізму гепатопротекторної активності [7, 11].

Сировинні ресурси для виробництва піфламіну практично безмежні. Горох є широко культивованою сільськогосподарською рослиною. Посівні площі гороху посівного в Україні займають більше 700 тис га.

Попередній фітохімічний і фармакогностичний аналіз показав наявність у піфламіні флавоноїдних сполук. Характерними флавоноїдними глікозидами є моно-, ди- і триглікозиди кверцетину і кемпферолу, які часто ацильовані по кінцевому цукровому залишку. Флавоноїдні сполуки зарекомендували себе як антиоксиданти і мембраностабілізуючі речовини. Дослідження флавоноїдів і поліфенолів проводили за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів аналізу [2, 14, 15, 16, 17].

Методами паперової хроматографії (ПХ) і тонкошарової хроматографії (ТШХ) у піфламіні виявлені гуанідини, які також можуть бути складовою частиною амінокислот (аргінін), нуклеїнових кислот та протоалкалоїдів гороху посівного. Гуанідинові похідні виділені з рослинного препарату разом з амінокислотами, потім були розділені на колонках із силікагелем, із катіонно-обмінними смолами та у тонкому шарі сорбенту. Використані системи розчинників: 2 М розчин аміаку — етиленгліколь - пропанол (3:1:6), вода - етиленгліколь - пропанол - бутанол (4:1:1:4), вода — фенол (1:4 за масою) та ін. Для ПХ гуанідинів використані системи: н-бутанол-оцто-

ва кислота-вода (12:3:5), фенол-вода-аміак (5:1.25:0.9). Як хромогенні проявники застосовували нінгідрин, реактив Яффе (для лактамів  $\alpha$ -гуанідинкислот), ізатин,  $\alpha$ -нафтол (реакція Сакагутті), суміш натрію нітропрусид – гексаціаноферат (III) калію. Останній реактив найбільш вибірковий: із аргініном дає фіолетове забарвлення, гуанілсечовиною – жовтогаряче, гуанідином – червоно-жовтогаряче, гуанідиноцтовою кислотою – яскраво-червоне. Кількісне визначення проводили за допомогою методів фотоколориметрії та спектрофотометрії на основі визначення оптичної густини утворених забарвлених комплексів із міді сульфатом, нінгідрином.

Використовуючи метод лазерної мас-спектрометрії з регістратором на фотоплівку УФ-4 на лазерному мас-спектрометрі високого розрешення по Маттеуху-Герцогу МС 3101 із мікрофотометром реєструючим "ЕФО-451", були визначені макро-і мікроелементи в таблетках піфламину. Виявлені такі макро- і мікроелементи (мас %): В - 0.0056; F - 0.024; Na - 0.3; Mg - 0.83; Al - 0.012; Si - 0.19; P - 0.15; S - 0.53; Cl - 0.32; K - 2.64; Ca - 0.62; Mn - 0.005; Fe - 0.03.

Якість субстанції контролювали за показниками: опис, ідентифікація, важкі метали, залишкові кількості органічних розчинників (хлороформ і спирт етиловий), визначення кількісного вмісту поліфенолів, флавоноїдів, відновлюючих цукрів, амінокислот.

#### Експериментальна частина

Піфламін – аморфний, гігроскопічний порошок світло-коричневого кольору зі специфічним приємним запахом.

#### Ідентифікація

До 5 мл розчину А, приготованого для кількісного визначення, додають 1 мл розчину заліза окисного хлориду; з'являється зеленувато-буре забарвлення (фенольні сполуки).

5 мл розчину А, приготованого для кількісного визначення, поміщають у пробірку і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм; спостерігається блакитна флуоресценція (гідроксикоричні кислоти).

До розчину в пробірці додають 3 мл 3 % розчину алюмінію хлориду спиртового і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм; спостерігається зеленувато-жовта флуоресценція (флавоноїди).

0.5 г препарату поміщають у центрифужну пробірку, розчиняють у 5 мл води, додають 35 мл 96 % спирту, перемішують, залишають

на 10 хв до випадання осаду, і центрифугують зі швидкістю 3000 об/хв протягом 3 хв. Надосадову рідину зливають, до осаду додають 10 мл води, 2 мл кислоти хлористоводневої розведеної і нагрівають на киплячій водяній бані при перемішуванні протягом 5 хв. До одержаного розчину додають 10 мл реактиву Фелінга, нагрівають на водяній бані протягом 10 хв і фільтрують крізь паперовий фільтр "червона стрічка"; на фільтрі виявляється осад оранжево-червоного кольору (відновлюючі цукри).

0.25 г препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 10 мл води, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до позначки і перемішують. На лінію старту хроматографічної пластинки "Силуфол" розміром (5 × 15) см наносять у вигляді смужки довжиною 0.5 см 10 мкл одержаного розчину. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників: 96 % спирт - аміаку розчин концентрований (7:3) і хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде близько 6 см від лінії старту, пластинку виймають із камери і сушать на повітрі протягом 10 хв, потім знову поміщають в ту саму хроматографічну камеру і хроматографують у тих же умовах. Коли фронт розчинників пройде близько 12 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі, обробляють розчином нінгідрину і нагрівають у сушильній шафі при температурі 105 °С протягом 5 хв. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися плями червоного кольору,  $R_f \times 100$  яких дорівнюють: близько 18 (аргінін), 31 (лізин), 46 (кислота глютамінова) і 55 (серин). Допускається наявність додаткових плям (амінокислоти).

*Примітка.* Приготування розчину нінгідрину. 0.075 г нінгідрину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 10 мл спирту н-бутилового, додають 0.75 мл кислоти оцтової льодяної, доводять об'єм розчину спиртом н-бутиловим до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 7 діб.

*Залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий і хлороформ)*

Близько 1 г (точна наважка) препарату поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють у 7 мл води, додають 1 мл розчину внутрішнього стандарту, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують.

По 1 мкл одержаного розчину і розчину стандартного зразка (СЗ) спирту етилового і

хлороформу поперемінно хроматографують на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором, одержуючи не менше 5 хроматограм у таких умовах:

- колонка капілярна кварцева HP-FFAP-001 фірми "Hewlett Packard" (США), розміром 30 м × 0.53 мм, нерухома фаза — поліетиленгліколь, модифікований терефталевою кислотою, із товщиною шару 1мкм;
- температуру колонки програмують: 70 °С — 4 хв, 20° /хв., 140 °С - 5 хв;
- температура випарника - 130° С;
- температура детектора — 220° С;
- поділ потоку — 1:5.

Вміст спирту етилового ( $X_1$ ) у препараті, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{V_1 \times m_{01} \times 1 \times 10 \times 100}{V_{01} \times m_1 \times 10 \times 10} = \frac{V_1 \times m_{01} \times 10}{V_{01} \times m_1},$$

де:

$V_1$  - середнє значення відношень площ піків спирту етилового до площ піків ацетону (внутрішній стандарт), розраховане із хроматограм випробовуваного розчину;

$V_{01}$  - середнє значення відношень площ піків спирту етилового до площ піків ацетону (внутрішній стандарт), розраховане із хроматограм СЗ спирту етилового і хлороформу;

$m_1$  - маса наважки препарату, у грамах;

$m_{01}$  - маса наважки СЗ спирту етилового, у грамах;

Вміст спирту етилового у препараті має бути не більше 1.0 %.

Вміст хлороформу ( $X_2$ ) у препараті, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{V_2 \times m_{02} \times 1 \times 1 \times 10 \times 100}{V_{02} \times m_1 \times 10 \times 10 \times 10} = \frac{V_2 \times m_{02}}{V_{02} \times m_1},$$

де:

$V_2$  - середнє значення відношень площ піків хлороформу до площ піків 1,2-дихлоретану (внутрішній стандарт), розраховане із хроматограм випробовуваного розчину;

$V_{02}$  - середнє значення відношень площ піків хлороформу до площ піків 1,2-дихлоретану (внутрішній стандарт), розраховане із хроматограм розчину СЗ спирту етилового і хлороформу;

$m_1$  - маса наважки препарату, у грамах;

$m_{01}$  - маса наважки СЗ хлороформу, у грамах.

Вміст хлороформу в препараті має бути не більше 0.005 %.

*Примітки:* 1. Приготування розчину внутрішнього стандарту. 0.5 мл ацетону поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають мікрошприцом 2.5 мкл 1,2-дихлоретану, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 1 міс.

2. Приготування розчину СЗ спирту етилового і хлороформу. 3 мл води поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають близько 0.005 г (точна наважка) хлороформу, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (розчин 1).

3 мл води поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають близько 0.1 г (точна наважка) 96 % спирту, 1 мл розчину 1, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (розчин 2). Термін придатності розчинів 1 і 2 — 7 діб.

3 мл води поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 1 мл розчину 2, 1 мл розчину внутрішнього стандарту, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують. Розчин використовують свіжоприготованим.

3. Перевірка придатності хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком спирту етилового і хлороформу, має бути не менше 1000 теоретичних тарілок (ГФ XI, вип. 1, с.105);

- ступінь розділення піків спирту етилового й ацетону на хроматограмах розчину СЗ спирту етилового і хлороформу має бути не менше 1.8 (ГФ XI, вип. 1, с.105);

- висота піка хлороформу на хроматограмі розчину СЗ спирту етилового і хлороформу має бути не менше 20 % шкали реєструючого пристрою.

#### *Кількісне визначення*

0.12 г (точна наважка) препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 14 мл води, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до позначки і перемішують (розчин А).

Флавоноїди. 10 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 4 мл 3 % розчину алюмінію хлориду спиртового, доводять об'єм розчину 70 % спиртом до позначки і перемішують.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину одержаного розчину за довжини хвилі 415 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, що містить 10 мл розчину А, доведеного у мірній

колбі місткістю 25 мл до позначки 70 % спиртом.

Вміст суми флавоноїдів ( $X_1$ ) у препараті, у перерахунку на рутин і суху речовину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{215 \times 10 \times m \times (100 - W)} = \frac{D \times 12500}{215 \times m \times (100 - W)}$$

де:

D - оптична густина випробовуваного розчину;

m - маса наважки препарату, у грамах;

215 - коефіцієнт питомого поглинання рутину за довжини хвилі 415 нм;

W - втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми флавоноїдів у препараті, у перерахунку на рутин і суху речовину, має бути не менше 1.8 %.

**Поліфенольні сполуки.** 2 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину 40 % спиртом до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густина одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують 40 % спирт.

Вміст суми поліфенольних сполук ( $X_2$ ) у препараті, у перерахунку на кислоту галову і суху речовину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{540 \times 2 \times m \times (100 - W)} = \frac{D \times 62500}{540 \times m \times (100 - W)}$$

де:

D - оптична густина випробовуваного розчину;

m - маса наважки препарату, у грамах;

540 - коефіцієнт питомого поглинання кислоти галової за довжини хвилі 270 нм;

W - втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми поліфенольних сполук у препараті, у перерахунку на кислоту галову і суху речовину, має бути не менше 4.5%.

**Відновлюючі цукри.** 1 мл розчину А поміщають у конічну колбу місткістю 25 мл і додають 20 мл ортотолуїдинового реактиву. Колбу поміщають на киплячу водяну баню, витримують протягом 10 хв, охолоджують до кімнатної температури. Розчин кількісно переносять двома порціями по 5 мл 70 % спирту в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину 70% спиртом до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густина одержаного розчину за довжини хвилі 610 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують 70 % спирт. Паралельно вимірюють оптичну густина розчину, який містить 2.5 мл розчину СЗ глюкози, обробленого аналогічно до розчину А, починаючи зі слів: "... додають 20 мл ортотолуїдинового реактиву...", використовуючи як розчин порівняння 70 % спирт.

Вміст суми відновлюючих цукрів ( $X_3$ ) у препараті, у перерахунку на глюкозу і суху речовину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_3 = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 25 \times 20 \times 2.5 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 100 \times 50 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 100}{D_0 \times m \times (100 - W)}$$

де:

D - оптична густина випробовуваного розчину;

$D_0$  - оптична густина розчину СЗ глюкози;

m - маса наважки препарату, у грамах;

$m_0$  - маса наважки СЗ глюкози, у грамах;

W - втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми відновлюючих цукрів у препараті, у перерахунку на глюкозу і суху речовину, має бути не менше 11 %.

**Амінокислоти.** Близько 0.12 г препарату (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл води, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують. 1 мл одержаного розчину поміщають у конічну колбу місткістю 50 мл, додають 8 мл 0.2 % розчину нінгідрину в спирті ізопропіловому і нагрівають на водяній бані протягом 5 хв при температурі 80 °С. Охолоджують до кімнатної температури, кількісно переносять двома порціями по 5 мл спирту ізопропілового в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину спиртом ізопропіловим до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густина одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 573 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, який містить 8 мл 0.2 % розчину нінгідрину в спирті ізопропіловому і доведений спиртом ізопропіловим у мірній колбі місткістю 25 мл до позначки.

Вміст суми амінокислот ( $X_4$ ) у препараті, у перерахунку на лейцин і суху речовину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_4 = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{862 \times m \times 1 \times (100 - W)} = \frac{D \times 125000}{862 \times m \times (100 - W)}$$

де:

D - оптична густина випробовуваного розчину;

m - маса наважки препарату, у грамах;

862 - коефіцієнт питомого поглинання комплексу лейцину з нінгідрином за довжини хвилі 573 нм;

W - втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст суми амінокислот у препараті, у перерахунку на лейцин і суху речовину, має бути не менше 2.5 %.

Примітки: 1. Приготування 3 % розчину алюмінію хлориду спиртового. 3.0 г алюмінію хлориду шестиводного (ГОСТ 3759-75, х.ч. або ч.д.а.) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 60 мл 96 % спирту, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

2. Приготування розчину нінгідрину в спирті ізопропіловому. 0.2 г нінгідрину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 70 мл спирту ізопропілового, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

3. Приготування розчину СЗ глюкози. Близько 0.04 г (точна наважка) глюкози поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 80 мл 70 % спирту, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

20 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину 70 % спиртом до позначки і перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

4. Приготування ортотолуїдинового реактиву. 2 г тіосечовини (ГОСТ 6344-73, х.ч.) розчиняють у 94 мл кислоти оцтової льодяної, додають 6 мл ортотолуїдину (ТУ 6-09-2942-78) і перемішують. Термін придатності розчину 7 діб.

Допускається використання ортотолуїдинового реактиву промислового виробництва (ТУ 6-09-2164-76).

### Висновки

Розроблені методи стандартизації та наведено їх обґрунтування для нового лікарського фітопрепарату піфламін.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Гордієнко А.Д., Яковлева Л.В., Ковальова А.М., Кудкоцева О.В. Вплив піфламіну на функціональну активність мікросом із печінки щурів // Фармацевтичний журнал. — 1996. — № 6. — С. 76-78.

2. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука, 1990. — 333 с.

3. Яковлева Л.В., Чикіткіна В.В., Герасимова О.О., Ковальова А.М., Бунятян Н.Д. Гепатозахисні властивості Піфламіну — поліфенольного препарату з трави гороху посівного // Клінічна фармація. — Т. 2, № 1. — С. 71-74.

4. Ковальова А.М., Ковальов В.М., Комісаренко М.Ф., Городнянська Л.М. Дослідження фенольних сполук рослин родів горошок та горох // Вісник фармації. — 1994. — № 1-2. — С. 131-136.

5. Бабак О.Я., Кушнір І.Е., Бунятян Н.Д., Герасимова О.О., Ковальова А.М. Експериментально-клінічне вивчення нового гепатопротектора Піфламіну // Клінічна фармація. — 1999. — Т. 3, № 1. — С. 51-53.

6. Бунятян Н.Д., Герасимова О.А., Чикіткіна В.В., Ковалева А.М., Яковлева Л.М., Казьмин М.А. Изучение безвредности растительного гепатопротектора пифламина // Фармація. — 1999. — № 1. — С. 53-56.

7. Ковальова А.М. Визначення ліпотропної активності поліфенольних сполук рослинного походження // Вісник фармації. — 1999. — № 1. — С. 25-28.

8. Ковальова А.М., Комісаренко М.Ф., Ковальов В.М. Флавоноїди гороху посівного // Фармацевтичний журнал. — 1990. — № 6. — С. 66-67.

9. Ковалева А.М., Попова Н.В., Комиссаренко А.Н., Король В.В. Определение гуанидинов и стильбенов в растительном сырье // Лекарственные средства Украины: синтез, научные исследования, производство, реализация: Тез. докл. науч.-практ. конф. — Харьков, 1992. — С. 70.

10. Позитивне рішення про видачу патенту на винахід 88063104 України від 16.06.98 р. МКИ<sup>8</sup> А 61К 38/43, А 61К 9/20. Спосіб одержання комплексу БАР, що має гепатопротекторну дію і засіб для лікування захворювань печінки, який вміщує даний комплекс "Піфламін" / Ковальова А.М., Комісаренко А.М., Тимченко М.М., Черних В.П., Ковальов В.М., Походенко М.П., Стремоухов О.О., Герасимова О.О.

11. Комісаренко А.М., Ковальова А.М., Янченко П.С., Чалий О.Г. Пошук речовин з ліпазотропною активністю та дослідження ліпази // Природные биологически активные вещества и их синтетические аналоги: Тез. докл. науч.-практ. конф. Координационного Совета отд. химии НАН Украины. — Гурзуф, 2000 — С. 61-65.

12. Ковальова А.М., Яковлева Л.В., Тимченко М.М., Комісаренко А.М. Розробка лікарської форми на основі екстракту гороху посівного // Досягнення сучасної фармації — в медичну практику: Матеріали наук.-практ. конф., присв. 75-річчю УкрФА. — Харків, 1996. — С. 103.

13. Яковлева Л.В., Бунятян Н.Д., Ковалева А.М., Герасимова О.А., Чикіткіна В.В. Эффективность растительного полифенольного препарата пифламина при лекарственном поражении печени // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 1999. — Т. 61, № 6. — С. 48-50.

14. The British Pharmacopeia — 1993. — V.2, XVI B.A.P. — P.184-190.

15. The Extra Pharmacopeia - Martindale. — London: Pharm. Press, 1982 — 2082 p.

16. The United States Pharmacopeia, 23<sup>rd</sup> ed. — 1995. — P. 1681-1990.

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

*Резюме*

Ковалева А.М., Георгиевский Г.В., Ковалев В.Н., Комиссаренко А.Н., Тимченко Н.М.

**Разработка методов стандартизации нового лекарственного средства пифламин**

Разработаны методы стандартизации нового лекарственного средства пифламин – сухого экстракта, полученного из травы *Pisum sativum* L.. Приведено обоснование основных методов анализа пифламина.

*Summary*

Kovalyova A.M., Georgiyevskiy G.V., Kovalyov V.M., Komisarenko A.M., Tymchenko N.M.

**Development of new piflamin medicine standardization methods**

The methods of standardization of a new medicine piflamin - a dry extract made from *Pisum sativum* L. herb are developed. The substantiation of piflamin analysis basic methods is given

**Ковальова Алла Михайлівна.** Закінчила Харківський фармацевтичний інститут. Канд. фарм. наук. Доцент кафедри фармакогнозії НФАУ.

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

**Ковальов Володимир Миколайович** (н.1941). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1969). Доктор фарм. наук. Професор (1986). Зав. кафедрою фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України (1985).

**Комісаренко Андрій Миколайович** (н.1962). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1984). Доктор фарм. наук (2000). Доцент кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України.

**Тимченко Микола Михайлович** (н.1950). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1972). Директор дослідного заводу ДНЦЛЗ.

## Готові лікарські засоби

УДК 615.12: 615.322

Спиридонов В.Н., Кобзарь А.И., Чуешов В.И., Спиридонов С.В., Беликов В.В., Шермухамедова О.Г.  
Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков  
Национальная фармацевтическая академия Украины

### Сушка и деконтаминация гранул на основе активированных порошков семян каштана конского и отрубей пшеничных

Проведены исследования по расширению использования побочных биологических и физико-химических эффектов, сопутствующих основным технологическим процессам получения гранул. В результате проведенных исследований было выявлено, что операции увлажнения и грануляции являются благоприятными для набухания спор микроорганизмов, а стадия сушки - микробной деконтаминацией, что позволяет выгодно их использовать и без усложнения технологического процесса получать высококачественные гранулы из растительного сырья. На основе проведенных исследований разработан экономичный способ сушки и деконтаминации гранул из растительного сырья, имеющих высокий уровень микробной чистоты.

При выборе оптимальных составов вентропных препаратов на основе активированных измельчением семян каштана конского, отрубей пшеничных и сахарозы были приготовлены три состава А, В и С с различным соотношением указанных компонентов [1,2]. Различные партии растительного сырья, из которых производили препараты, были загрязнены микрофлорой и содержали в 1 г от 700 бактерий до 9000 бактерий, преимущественно спорообразующих, и от 50 грибов до 800 грибов различных видов как плесневых, так и дрожжевых. Целенаправленная декон-

таминация растительных порошков с помощью консервантов, УФ - облучения и высокотемпературного воздействия оказалась мало эффективной и дорогостоящей. Поэтому нашей целью стали исследования по расширению использования побочных биологических и физико-химических эффектов, сопутствующих основным технологическим процессам получения гранул, а также выявление уязвимых сторон жизнедеятельности микроорганизмов для более эффективного воздействия на них комплексом всех факторов.

Таблица 1

Результаты микробиологического анализа воздушно-сухих и увлажненных порошков семян каштана конского и отрубей пшеничных

Сырье	Содержание жизнеспособных микроорганизмов в 1 г порошков					
	Необработанные воздушно-сухие порошки		Воздушно-сухие порошки (100 °С, 90 мин)		Увлажненные порошки (100 °С, 90 мин)	
	бактерий	грибов	бактерий	грибов	бактерий	грибов
порошок семян каштана конского	1870	750	1050	60	330	25
порошок отрубей пшеничных	1690	610	1160	73	25	25

При изучении литературных данных о влиянии различных факторов и режимов термической деконтаминации растительного сырья и препаратов видно, что вегетативные формы бактерий погибают при температуре 60 °С-90 °С в течение 30-60 мин. Споровые формы бактерий погибают при более жестких режимах обработки, например, при кипячении (при температуре 100 °С) в течение от нескольких минут до 3 ч. Термическая обработка в автоклаве (при температуре 121 °С -132 °С) обеспечивает гибель спорных форм в течение 20-30 мин, а сухим жаром (при температуре 160 °С – 180 °С) - в течение 1-1.5 ч. При сопоставлении двух последних способов стерилизации видно, что с уменьшением содержания влаги в стерилизуемом объекте растет необходимость повышения температуры стерилизации, и при этом увеличивается время гибели спорных форм бактерий, что объясняется иным механизмом окисления макромолекул. Следовательно, содержание влаги является существенным фактором при выборе способа стерилизации [3, 4].

Кроме того, известно, что влага способствует набуханию и прорастанию спор микроорганизмов, а процесс сушки в естественных условиях приводит к гибели вегетативных клеток вследствие обезвоживания цитоплазмы и деструкции белков [4]. Известно также, что чем выше резистентность микроорганизмов, тем больше, в ряде случаев, время гибели вегетативных и спорных форм бактерий при действии на них различных температур [5].

Температурные режимы термической деконтаминации можно подразделить на 4 группы: мягкие (60 °С – 90 °С), средние (100 °С), жесткие (121 °С – 132 °С) и очень жесткие (160 °С – 180 °С).

Учитывая при этом значимость факторов влажности и обезвоживания, а также воз-

можность выбора при этом менее жестких режимов термической обработки, мы провели сравнительное изучение эффективности деконтаминации исходных порошков семян каштана конского и отрубей пшеничных при их обработке в воздушном стерилизаторе в сухом и увлажненном виде. Для этой цели порошки разделили на две серии. Образцы первой серии увлажняли водой до густой кашицеобразной массы, помещали в чашки Петри, выдерживали при комнатной температуре не более 1.5 ч с целью набухания спор микроорганизмов. Образцы второй серии представляли собой воздушно-сухие порошки.

Воздушно-сухие, а также увлажненные образцы порошков ставили в сушильный шкаф, нагретый до температуры 100 °С, выдерживали в течение 90 мин и исследовали на микробную чистоту. Результаты исследования представлены в Табл. 1.

Как видно из полученных результатов, число жизнеспособных бактерий в воздушно-сухих порошках, выдержанных при температуре 100 °С, незначительно уменьшилось, однако оставалось на высоком уровне, в увлажненных - снизилось примерно в 5 раз в порошке из семян каштана конского и примерно в 67 раз в порошке отрубей пшеничных. Термическая обработка оказалась очень эффективной в отношении грибов в обоих образцах. Число их не превышало допустимые пределы в лекарственных средствах для приема внутрь. Таким образом, метод, сочетающий увлажнение и нагревание, открывает перспективу получения более качественной по микробиологической чистоте продукции, поскольку способствует набуханию спор микроорганизмов, которые становятся более чувствительными к нагреванию, что, в свою очередь, обеспечивает более быструю их гибель. Поскольку отдельная деконтаминация

порошков трудоемка, мы решили совместить эти операции при получении гранул.

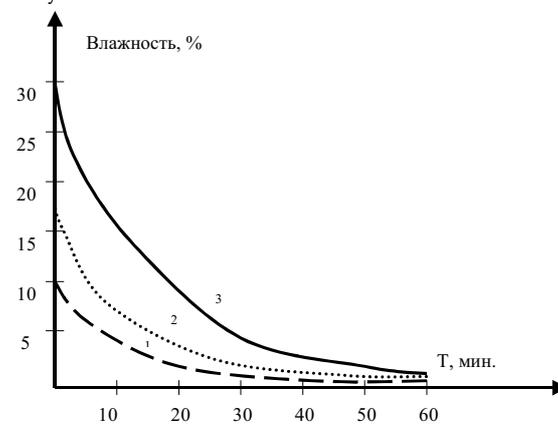
С учетом вышесказанного мы проанализировали по операциям технологию получения гранул с тем, чтобы обоснованно и более полно использовать выгодные факторы и выбрать эффективные, но как можно менее жесткие режимы термической обработки, которые обеспечивают максимальную гибель микроорганизмов и сохранение биологически активных веществ. Технологический процесс получения гранул включает операции увлажнения порошков, их перемешивание, влажную грануляцию и загрузку гранул в лотки для сушки. Он проходит при комнатной температуре в течение 1-1.5 ч и может считаться благоприятным как подготовительная операция, так как за это время происходит набухание спор микроорганизмов.

Далее происходят процессы нагревания и испарения влаги из гранулята, которые пагубно действуют на «пробудившуюся» вегетативную и споровую микрофлору. Следует заметить, что составы А, В и С с увеличением содержания в них доли растительных порошков содержат и возрастающие количества воды, пошедшие на их увлажнение (9 %, 20 % и 33 %, соответственно). Изменение содержания влаги в гранулах при их сушке на лабораторном экспресс-влажномере на основе торсионных весов ВТ-500 представлено на Рис. 1. Из рисунка видно, что наиболее интенсивное испарение влаги происходит в первые 10-20 мин, потом оно падает. При этом самая короткая и наиболее быстрая сушка до остаточной влажности 2 %-3 % у состава А (25 мин), затем у состава В (45 мин), а наиболее длительная - у состава С (60 мин).

Поскольку процесс сушки и деконтаминации больших количеств гранулятов с различной влажностью предусматривает использование сушильных шкафов (2Ш-0-01), в которых испарение влаги снижает температуру и увеличивает продолжительность сушки, нами

изучено влияние изменения температуры во время процесса испарения влаги на конечную эффективность деконтаминации гранул.

Рисунок 1



Изменение содержания влаги в гранулах составов А(1), В(2) и С(3)

Для этой цели влажные гранулы (масса до 500 г, толщина слоя до 1.0 см) помещали в сушильные шкафы, нагретые до температуры 100 °С, и через каждые 10 мин измеряли температуру. Изменение температуры представлено на Рис. 2, из которого видно, что в период быстрого испарения влаги температура сначала резко падает и тем ниже, чем выше влажность. Затем температура начинает расти и достигает исходной тем быстрее, чем ниже влажность.

Определение общего числа бактерий и грибов в полученных гранулах проводили в соответствии с требованиями ГФУ. Результаты определений представлены в Табл. 2, из которой видно, что после сушки в соответствующих интервалах температур и времени были получены гранулы, в которых содержание жизнеспособных бактерий в 5-10 и более раз меньше, чем в исходных продуктах.

Таким образом, операции увлажнения и грануляции являются благоприятными для набухания спор микроорганизмов, а стадия сушки - микробной деконтаминацией, что по-

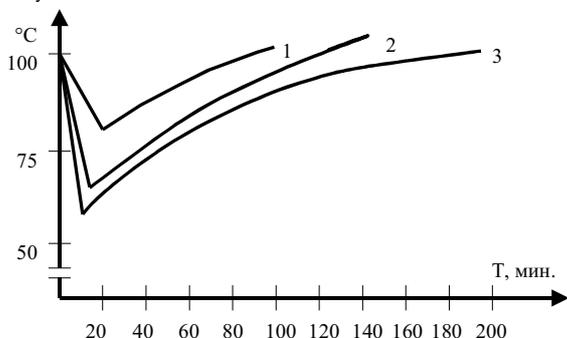
Таблица 2

Микробиологическая чистота гранул составов А, В и С

Состав	Число жизнеспособных микроорганизмов в 1 г гранул		Бактерии		
	бактерий	грибов	сем. Enterobacteriaceae	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
А	217	25	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
В	234	20	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
С	198	25	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют

зволяєт вигодно їх використовувати й без ускладнення технологічного процесу одержувати високоякісні гранули з рослинної сировини. На основі проведених досліджень розроблений економічний спосіб сушення та деконтамінації гранул із рослинної сировини, що мають високий рівень мікробної чистоти.

Рисунок 2



Изменение температуры в процессе сушки гранул составов А (1), В (2) и С (3).

### Выводы

1. Проведены исследования по расширению использования побочных биологических и физико-химических эффектов, сопутствующих основным технологическим процессам получения гранул.

2. На основе проведенных исследований разработан экономичный способ, сочетающий сушку и деконтаминацию гранул из растительного сырья, имеющих высокий уровень микробной чистоты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Спиридонов В.Н., Чуешов В.И., Яковлева Л.В., Спиридонов С.В. и др. Разработка состава препаратов венотропного действия // Фармаком. - 1999. - № 5. - С. 27-28.
2. Чуешов В.И., Спиридонов С.В. Розробка технології і вивчення властивостей гранул каштану // Фармац. журн. - 1999. - № 6. - С. 84 - 87.
3. Скубко Т.П. Микробная контаминация лекарственных средств // Технология и стандартизация лекарств. - Х.: ООО «Рирег». - 1996. - С. 520-536.
4. Пяткин К.Д., Кривошеин В.С. Микробиология. - М.: Медицина, 1981. - 512 с.
5. Тимофеев Н.С., Тимофеев Н.Н. Асептика и антисептика. - М.: Медицина, 1980. - С. 3-51.

### Резюме

Спиридонов В.М., Кобзар Г.І., Чуешов В.І., Спиридонов С.В., Беліков В.В., Шермухамедова О.Г.

### Сушення та деконтамінація гранул на основі активованих порошоків насіння гіркокаштану звичайного та висівки пшеничних

Проведені дослідження з розширення використання побічних біологічних і фізико-хімічних ефектів, супровідних основним технологічним процесам одержання гранул. У результаті проведених досліджень виявлено, що операції зволоження та грануляції є сприятливими для набухання спор мікроорганізмів, а стадія сушення — мікробною деконтамінацією, що дозволяє ви-

гідно їх використовувати й без ускладнення технологічного процесу одержувати високоякісні гранули з рослинної сировини. На основі проведених досліджень розроблений економічний спосіб сушення та деконтамінації гранул із рослинної сировини, що мають високий рівень мікробної чистоти.

### Summary

Spiridonov V.N., Kobzar A.I., Chueshov V.I., Spiridonov S.V., Belikov V.V., Shermukhamedova O.G.

### Drying and decontamination of granules on basis of activated powders of horse-chestnut seeds and wheat bran

The investigations on extension of auxiliary biological and physico-chemical effects accompanying the main technological processes of granule obtaining were carried out. As a result of investigations carried out it was revealed that the moistening and granulating operations are favorable for swelling of microorganism spores and the drying stage - for microbial decontamination, allowing the profitably using of those and obtaining the high quality granules from plant raw materials without complication of manufacturing process. On a basis of investigations carried out the cost-effective method of drying and decontamination of granules from plant raw materials with high microbial purity level was developed.

### Спиридонов Владимир Николаевич (р. 1936).

Окончил фармацевтический факультет Московской медицинской академии. Работает в ГНЦАС (с 1958). Зав. лабораторией технологии детских лекарственных форм (1978). Науч. редактор журнала «Фармаком» (2001). Доктор фарм. наук (1988). Профессор (1990).

### Кобзарь Анна Ивановна.

Окончила биологический факультет Харьковского государственного университета (1970). Работает в ГНЦАС (с 1970). Зав. лабораторией микробиологических исследований (1994). Канд. биол. наук (1994).

### Чуешов Владислав Иванович (р. 1942).

Окончил Харьковский фармацевтический институт (1970). Работает в НФАУ (с 1971). Зав. кафедрой заводской технологии лекарств (ЗТЛ) (1987). Доктор фарм. наук (1986). Профессор (1989). Академик АН технологической кибернетики Украины (1994).

### Спиридонов Сергей Владимирович (р. 1974).

Окончил Украинскую фармацевтическую академию (1996). Ассистент кафедры ЗТЛ НФАУ. Канд. фарм. наук (2001).

### Беликов Владимир Владимирович (р. 1936).

Окончил 1-й Московский медицинский институт (фармацевтический факультет) (1959). Науч. редактор журнала «Фармаком» (2001). Доктор фарм. наук (1990).

### Шермухамедова Оксана Геннадиевна.

Окончила биологический факультет Харьковского государственного университета (1990). Работает в ГНЦАС (с 1990). Мл. науч. сотрудник (1997).

УДК 615.281

Белоконь И. Ф.

Государственный научный центр лекарственных средств (г. Харьков)

## Влияние вспомогательных веществ на противомикробную активность нитазола

Изучена противомикробная активность нитазола в отношении некоторых штаммов микроорганизмов-возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ), а также влияние различных вспомогательных веществ на потенцирование противомикробного эффекта готовых лекарственных средств, содержащих нитазол. В результате проведенных исследований разработан и внедрен в промышленное производство препарат гранулы «Полидеканит», который при минимальном содержании нитазола в дозе оказывает высокий эффект при лечении ОКИ, а также дисбактериозов, возникших в результате антибиотикотерапии.

Борьба с кишечными инфекционными заболеваниями и дисбактериозом является одной из важных задач отечественного здравоохранения. В связи с ухудшающейся экологической обстановкой, снижением уровня жизни в странах СНГ, загрязнением пищи и воды, кишечные инфекции становятся распространенным явлением, а инфекционные заболевания периодически принимают угрожающий характер.

К этиотропным лекарственным средствам, применяемым при кишечных инфекциях, относятся различные химиотерапевтические препараты, в том числе сульфаниламидные препараты, антибиотики, производные нитрофурана, курс лечения которыми длится от 7 до 14 и более суток. При этом возникает угроза развития устойчивых штаммов возбудителей инфекции, что также затрудняет и удлиняет курс лечения больного. Недостатком применения этих препаратов является развитие таких осложнений, как тошнота, рвота, диарея, аллергические реакции, нефропатия, нарушения кроветворной системы (лейкопения, агранулоцитоз). Частым осложнением интенсивной терапии антибиотиками, сульфаниламидными и др. препаратами является развитие дисбактериоза, который сопровождается упорными поносами, истощением, снижением иммунного статуса организма [1,2].

С целью уменьшения риска возникновения упомянутых побочных явлений при лечении кишечных инфекционных заболеваний широко используются препараты на основе субстанций преимущественно природного происхождения, таких как пектин, крахмал, белая глина, целлюлоза и др. [3,4].

Известные зарубежные препараты «Капект», «Гелопектоза», «Каопектат» обладают комплексным антидиарейным действием за счет входящих в их состав как минеральных

веществ, улучшающих электролитный состав крови, так и растительных веществ с адсорбирующим и обволакивающим действием, оказывающих влияние на формирование каловых масс и уменьшающих при этом раздражение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [5,6].

Целью наших исследований являлось создание высокоэффективного противомикробного лекарственного препарата со сниженным побочным действием, применяющегося для лечения острых кишечных инфекций различной этиологии.

Объектом изучения был выбран нитазол (2-ацетиламино-5-нитротиазол), который выпускается промышленностью в виде таблеток по 0.1 г, вагинальных суппозиториях по 0.12 г и в форме аэрозолей по 60 г, содержащих 1.02 г нитазола. Эти лекарственные формы широко применяются в медицинской практике для лечения протозойных инфекций и обычно хорошо переносятся больными [1].

В связи с недостатком литературных данных о противомикробной активности нитазола в отношении возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ), нашей первоначальной задачей было изучение действия нитазола на самые распространенные штаммы микроорганизмов — возбудителей ОКИ, а также возможность потенцирования противомикробного действия нитазола под влиянием различных вспомогательных веществ.

В качестве вспомогательных использованы вещества растительного происхождения с адсорбирующими и обволакивающими свойствами (пектин, целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ), крахмал и др.), корригенты вкуса (сахар, глицирам), консерванты (кислота сорбиновая, декаметоксин), а также натрия хлорид, нормализующий электролитный состав крови при острых диареях.

Для экспериментального изучения противомикробной активности были использованы как отдельные образцы нитазола, кислоты сорбиновой, декаметоксина, так и их совместные композиции с добавлением различных вспомогательных веществ (Табл. 1).

Исследования противомикробной активности образцов на возбудителей ОКИ проводились в лаборатории клинической микробиологии ХНИИМИ им. Мечникова (под руководством зав. лабораторией, канд. биол. наук Дьяченко В.Ф.).

#### Методы исследования

Образцы 1, 2, 3, 4, 5 предварительно разбавляли теплой водой очищенной до конечной концентрации: нитазола – 0.5 %, декаметоксина – 0.01 % и кислоты сорбиновой – 0.4 %.

Образцы 6, 7, 8, 9, 10 из-за высокой вязкости растворов перед испытанием дополнительно разбавляли 5-ти кратным количеством теплой воды очищенной, поэтому концентрация нитазола, декаметоксина и кислоты сорбиновой них в 5 раз меньше, чем в образцах 1, 2, 3, 4, 5.

Для изучения противомикробной активности использовались музейные штаммы микроорганизмов – наиболее распространенных возбудителей ОКИ, представителей группы энтеробактерий и других видов микроорганизмов, а также штамм неагглютинирующего (НАГ) холерного вибриона (Табл. 2).

Все тест-культуры микроорганизмов выращивали на плотных питательных средах в течение 24 ч при температуре 37 °С.

Для исследования использовали только те культуры, которые характеризовались однородностью колоний, типичными морфологическими свойствами, биохимической актив-

ностью. Холерный вибрион выращивали на щелочном агаре.

Для изучения противомикробной активности образцов суточные культуры тест-штаммов смывали с плотной питательной среды стерильным физиологическим раствором и стандартизовали по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Микробная нагрузка для всех тест-культур составляла  $10^7$  КОЕ/мл.

Противомикробную активность образцов определяли методом диффузии в агар (метод колодцев) на плотной питательной среде, разлитой в чашки Петри в два слоя.

В подобранные чашки Петри (с плоским дном), установленные на горизонтальной поверхности, отрегулированной по ватерпасу, разливали по 10 мл незараженного «голодного агара».

На застывший нижний слой помещали цилиндры из нержавеющей стали (высота 10 мм, наружный диаметр 8 мм) и в чашки заливали 15 мл «зараженной» питательной среды, элективной к засеянному в нее тест-микроорганизму. После застывания верхнего слоя агара цилиндры вынимали и в образовавшиеся лунки вносили исследуемые образцы в количестве  $(0.3 \pm 0.05)$  г (или мл). На одной чашке Петри испытывали активность шести образцов. Посевы помещали в термостат на 24 ч при температуре 37 °С. Каждое определение повторяли 5 раз. Учет результатов проводили через 24 ч путем измерения диаметра зон задержки роста тест-микроорганизмов. Результаты учитывали по диаметру зоны задержки роста (включая диаметр лунок).

Результаты изучения антибактериальной активности исследованных образцов пред-

Таблица 1  
Состав образцов (в %)

образец	нитазол	декаметоксин	кислота сорбиновая	глицирам	натрия хлорид	пектин	целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ)	крахмал	сахар
1	0.5	-	-	- -	-	-	-	-	-
2	-	0.01	-	- -	-	-	-	-	-
3	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
4	0.5	0.01	0.4	-	-	-	-	-	-
5	0.5	0.01	0.4	0.1 -	-	-	-	-	-
6	0.5	0.01	0.4	0.1	0.9	-	-	-	-
7	0.5	0.01	0.4	0.1	0.9	10.0	-	-	-
8	0.5	0.01	0.4	0.1	0.9	10.0	10.0	-	-
9	0.5	0.01	0.4	0.1	0.9	10.0	10.0	20.0	-
10	0.5	0.01	0.4	0.1	0.9	10.0	10.0	20.0	до 100.0

ставлены в Табл. 2, из которой видно, что нитазол в концентрации 0.5 % оказывает противомикробное действие на все изученные штаммы микроорганизмов, за исключением синегнойной палочки. Его активность достигает значения от 13.6 мм (на протеи, йерсинии) до 20.2 мм (на гафнии, кишечную палочку). Активность декаметоксина в концентрации 0.01 % проявляется в отношении всех изученных микроорганизмов в значениях от 12.2 мм до 18.4 мм, в том числе, ингибирует рост синегнойной палочки. Кислота сорбиновая в концентрации 0.4 % не задерживает рост исследуемых микроорганизмов.

Состав 4, представляющий собой смесь трех компонентов, отличается более высокой активностью по отношению к некоторым микроорганизмам (кишечная палочка, клебсиелла, сальмонелла, гафнии) по сравнению с отдельно взятыми нитазолом и декаметоксином. С введением в состав вспомогательных веществ (глицирама, пектина, МКЦ, крахмала) наблюдается рост противомикробной активности на эти же микроорганизмы составов 5,6,7,8 и 9.

Наиболее высокую противомикробную активность, превосходящую по действию нитазол и декаметоксин в 1.3 раза, проявил состав 10 (от 14.2 мм до 26.4 мм), несмотря на низкое содержание нитазола из-за дополнительного разбавления составов водой (в 5 раз).

Как видно из Табл. 2, состав 10 отличается более высокой активностью и в отноше-

нии неагглютинирующего холерного вибриона (22.7 мм).

Этот же состав, как наиболее оптимальный и эффективный, впоследствии был использован при создании препарата гранулы «Полидеканит», применяемого для лечения ОКИ.

Следует отметить, что введение в состав гранул вспомогательных веществ обволакивающего и адсорбирующего действия, таких как крахмал, целлюлоза микрокристаллическая, пектин позволило значительно повысить его терапевтический эффект.

Проведенными экспериментальными исследованиями выявлено, что глицирам, обладающий поверхностно-активными свойствами, в концентрации 0.1 % не только проявляет стабилизирующий и корригирующий эффект в смеси с сахаром, но и оказывает солюбилизующее действие, благодаря которому растворимость нитазола в составе гранул «Полидеканит» возрастает почти в 1.5 раза по сравнению с таблетками и субстанцией.

Оптимальный подбор вспомогательных веществ, обладающих адсорбирующим и обволакивающим действием, позволил повысить специфическую активность гранул «Полидеканит», расширить противомикробный спектр действия нитазола в гранулах по сравнению с другими его лекарственными формами, а также способствовал проявлению противодиарейного эффекта и оказанию норма-

Таблица 2

**Влияние вспомогательных веществ на антибактериальную активность нитазола**

Тест - микроорганизмы	Зона задержки роста (мм) под воздействием испытуемых образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Echerichia coli	19.8	18.7	0	22.5	24.1	15.8	23.6	23.2	22.7	21.4
Schigella boudii	19.1	15.7	0	19.8	18.2	18.5	17.8	19.4	20.2	20.4
Salmonella enter.	16.9	16.2	0	20.1	19.7	19.4	18.9	19.6	20.1	20.0
Proteus vulgaris	14.2	15.8	0	15.6	16.1	15.8	16.2	16.9	17.4	17.8
Proteus mirab.	13.6	15.0	0	16.0	15.8	16.2	16.3	16.8	16.6	17.0
Klebsiella pneum.	18.6	14.2	0	22.1	20.9	22.4	21.8	22.6	22.9	23.1
Enterobacter aer.	12.4	12.6	0	14.2	14.0	13.8	13.4	14.0	14.2	14.2
Citrobacter diversus	18.8	15.4	0	18.0	17.8	18.2	18.4	17.6	18.0	18.8
Yersinia enteroc.	12.0	13.6	0	13.8	13.6	14.2	13.8	14.2	14.0	14.6
Serratia marces.	20.0	22.4	0	22.8	22.4	22.0	22.1	24.6	24.2	25.4
Edwardsiella tar.	16.8	15.4	0	16.8	18.2	17.6	17.4	18.5	18.4	18.2
Hafnia alvei	20.2	18.4	0	22.6	24.5	20.8	25.4	23.4	24.6	26.2
Ervinia coratovora	18.2	16.5	0	22.0	23.2	22.6	24.4	24.2	24.8	26.4
Pseudomonas aer.	0	12.2	0	12.4	12.6	13.0	13.2	13.1	15.2	15.4
Staphylococcus aureus	16.8	16.4	0	18.3	18.5	18.4	20.2	20.4	20.9	22.4
НАГ холерный вибрион	18.2	16.4	0	18.6	18.4	18.4	18.9	20.2	20.1	22.7

лизующего действия на состав микрофлоры кишечника.

Таким образом, в результате проведенных научно-экспериментальных исследований создан препарат гранулы «Полидеканит» (в однодозовых пакетах по 3 г), содержащий в одной дозе 0.015 г действующего вещества — нитазола, что в 6.7 раза меньше, чем в таблетках, и применяемый для лечения острых и хронических бактериальных диарей различной этиологии, в том числе и холеры.

По результатам клинических испытаний, проведенных в 1999 году на базах кафедры инфекционных заболеваний, фтизиатрии и эпидемиологии МИ УАНМ (г. Киев) и Областной клинической инфекционной больницы (г. Харьков), установлено, что гранулы «Полидеканит» обладают высоким эффектом при лечении диарей инфекционной этиологии и дисбактериоза, вызванную антибиотикотерапией. Курс лечения препаратом составляет 2-3 дня.

Кроме того, дополнительные исследования препарата гранулы «Полидеканит», проведенные в Институте терапии АМН (под руководством доктора мед. наук Фадеенко Г.Д.), показали его более высокую эффективность при комплексном лечении язв желудка и двенадцатиперстной кишки, вызванных бактериями *Helicobacter pylori* (Hр) по сравнению с метронидазолом [7,8].

Гранулы «Полидеканит» внедрены в промышленное производство и выпускаются фармацевтической фирмой «Здоровье», г. Харьков.

### Выводы

В результате проведенных исследований выявлено противомикробное действие нитазола в отношении 16 штаммов микроорганизмов - возбудителей ОКИ.

Изучено влияние различных вспомогательных веществ на усиление противомикробного действия нитазола.

Разработан и внедрен в производство на фармацевтической фирме «Здоровье» препарат гранулы «Полидеканит» в однодозовых пакетах, который при минимальном содержании нитазола (0.015 г в одной дозе) оказывает высокий терапевтический эффект при лечении ОКИ (курс лечения от 1 до 3 дней).

Препарат гранулы «Полидеканит» также нормализует полезную микрофлору кишечника, поэтому его рекомендуют для лечения дисбактериоза, возникшего в результате антибиотикотерапии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. - Ч. 2.- Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1990. - 528 с.
2. Харченко Н.В., Черненко В.В. Лечение и профилактика дисбактериоза кишечника // Гастроэнтерология. - 1999. - Вып. 29. - С. 212-215.
3. А.С. 1803118, RU, МКИ А 61 к 35/78, 31/245, 31/52. Способ лечения дизентерии / Н.Д. Ющук, В.М. Фролов, В.Д. Лукьянчик и др. (Россия). - Оpubл. 23.03.93. - Бюл. № 11.
4. Патент 2108106, RU, МКИ А 61 к 35/78. Пектиновый препарат для лечения диарейных инфекций человека и животных / Потиевский Э.Г. (Россия). - Оpubл. 10.04.98. - Бюл. № 10.
5. Vidal. Лекарственные препараты в России. - М.: АстраФармСервис, 2001. - 1536 с.
6. L'Informatore Farmaceutico. - 1981.
7. Фадеенко Г.Д., Белоконь И. Ф., Заболотный В. А., Чепелюк В. И. Эффективность препарата «Полидеканит» при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Фармаком. - 2001.- №1. - С.73-75.
8. А.З. 2000095369, UA, МКИ А 61 к 31/4439. Спосіб лікування захворювань, асоційованих з *Helicobacter pylori* / Бабак О.Я., Фадеенко Г.Д., Чепелюк В.І. та ін. (Україна).

### Резюме

Білоконь І.Ф.

### Вплив допоміжних речовин на протимікробну активність нітазолу

Вивчена протимікробна активність нітазолу по відношенню до деяких штамів мікроорганізмів-збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ), а також вплив різних допоміжних речовин на потенціювання протимікробного ефекту готових лікарських засобів, що містять нітазол. У результаті проведених досліджень розроблений і впроваджений у промислове виробництво препарат гранули «Полідеканіт», що при мінімальному вмісті нітазолу в дозі виявляє високий ефект у лікуванні ГКІ, а також дисбактеріозів, що виникли внаслідок антибіотикотерапії.

### Summary

Belokon I.F.

### Effect of excipients on antimicrobial activity of nitazol

The antimicrobial effect of nitazol in respect to some strains of microbial agents of acute intestinal infections (AII), as well as effect of various excipients on potentiation of antimicrobial effect of finished drugs containing nitazol, were studied. As a result of investigations carried out the drug Polydecanit, in granules, which, at minimum content of nitazol in the dose, shows the high effect when treating AII as well as dysbacteriosis originated due to antibiotic therapy, was developed and implemented into industrial production.

**Белоконь Иоана Фегоровна.** Работает в ГНЦЛС (с 1978). Ст. науч. сотрудник. Канд. фарм. наук (1988).

## Рослинні препарати та їх фармакологічна дія

УДК 577.344.3:615.277.3:547.973:547.978.4:582.657.24

Абу Захер Кхалед, Журавлев Н.С., Мартынов А.В.  
Национальная фармацевтическая академия Украины  
Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины

### Изучение фотодинамической противоопухолевой активности суммы катехинов и лейкоантоцианидинов видов рода щавель

Изучена фотодинамическая противоопухолевая активность суммы катехинов и лейкоантоцианидинов, выделенных из подземных органов щавелей зубчатого, красивого и пирамидального. Результаты фармакологического эксперимента показывают, что изучаемые суммы обладают противоопухолевой активностью по отношению к культуре асцитной формы рака Эрлиха. Это позволяет считать их перспективными для создания новых лекарственных средств противоопухолевого действия.

Одним из возможных путей повышения эффективности лечения различных заболеваний является использование препаратов, полученных на основе лекарственного растительного сырья. В настоящее время находят применение лекарственные препараты растительного происхождения, обладающие цитостатическими свойствами [1-8].

Внимание биологов и фитохимиков давно привлекают растения рода щавель, которые издавна применяются в народной медицине при различных заболеваниях [9,10]. Это обуславливает интерес к изучению содержащихся в них биологически активных веществ, оказывающих слабительное, вяжущее, противовоспалительное, антисептическое, кровоостанавливающее, желчегонное, мочегонное и др. действия [11,12].

Поэтому в качестве объектов исследования нами были выбраны щавель пирамидальный (*Rumex thyrsoiflorus* F.) флоры Украины, щавель красивый (*Rumex pulcher* L.) и щавель зубчатый (*Rumex dentatus* L.) флоры Палестины.

В ходе исследований вегетативных и генеративных органов изучаемых видов щавелей установлено наличие в них антрахинонов, флавоноидов, катехинов, лейкоантоцианидинов, оксикоричных кислот, дубильных веществ, аминокислот, микроэлементов, аскорбиновой и щавелевой кислот [13-16].

Нами был модифицирован метод выделения суммы катехинов и лейкоантоцианидинов из подземных органов изучаемых видов щавеля и изучена их антиоксидантная и антиокислительная активность *in vitro* на базе ГНЦЛС [17] и антиоксидантная и мембрано-

стабилизирующая активность *in vivo* на кафедре фармакологии НФАУ [18].

Целью настоящего исследования явилось изучение фотодинамической противоопухолевой активности суммы катехинов и лейкоантоцианидинов, выделенной из подземных органов щавелей пирамидального (сумма 1), красивого (сумма 2) и зубчатого (сумма 3) в культуре клеток рака Эрлиха *in vitro*.

#### Материалы и методы

Исследования проводили *in vitro* по методу Чернова В.А. [19]. Для этого асцитную жидкость неимбредных мышей, больных асцитной аденокарциномой Эрлиха, смешивали с растворами выделенных сумм катехинов и лейкоантоцианидинов в различных разведениях. Асцитная аденокарцинома Эрлиха была предоставлена заведующей лабораторией криоиммунологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, профессором А.А. Цуцаевой. Препараты готовили на растворе Хенкса. Смесь инкубировали в термостатах в течении 2 – 4 час при температуре 37 °С. После этого асцитную жидкость смешивали с 2 % раствором эозина и устанавливали процент поврежденных (окрашенных) клеток цитологическим методом. Следует отметить, что полученные суммы лейкоантоцианидинов и катехинов изменяли рН среду до слабокислой.

Также исследовали фотодинамические эффекты выделенных сумм катехинов и лейкоантоцианидинов: клетки, обработанные исследуемыми веществами, облучали красным лазером нетепловой мощности (длина волны 565 нм) в пробирках (вдоль оси проби-

рок) в течение 5 мин, потом инкубировали в течение 30 мин и окрашивали эозином [20].

Результаты исследований приведены в таблице.

### Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов исследования, выделенные суммы были относительно токсичными для культуры асцитной формы рака Эрлиха, но оптимальными для исследования были концентрации действующих веществ от 0.2 мкг/мл до 2.0 мкг/мл. Эти концентрации являются очень низкими, но достаточными для активации апоптоза клеток после облучения их монохроматическим светом. Наиболее перспективной является сумма лейкоантоцианидинов и катехинов, выделенная из щавеля красивого, которая является наименее токсичной суммой и имеет наиболее фотодинамические свойства: при концентрации 0.2 мкг/мл и облучении лазером она приводит к гибели 90.5% раковых клеток.

В механизме фотовозбуждения суммы катехинов и лейкоантоцианидинов и последующих биохимических превращениях в тест-культурах при световом облучении остается много неизвестного, однако установлено значительное возрастание противоопухолевой

активности сумм катехинов и лейкоантоцианидинов.

### Выводы

1. Впервые изучена фотодинамическая противоопухолевая активность суммы катехинов и лейкоантоцианидинов, выделенных из корневищ с корнями щавелей зубчатого, красивого и пирамидального.

2. Результаты исследований показывают, что все три изучаемые суммы обладают противоопухолевой активностью, в наибольшей степени выраженной у суммы 2, которая в концентрации 0.2 мкг/мл приводит к гибели 90.5% раковых клеток.

3. Результаты фитохимических и фармакологических исследований щавелей зубчатого, красивого и пирамидального показывают перспективность создания противоопухолевых средств на основе сумм катехинов и лейкоантоцианидинов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пашинский В.Г., Модяев В.П., Байковский В.В. Влияние растительных препаратов на развитие индуцированных и спонтанных опухолей // Актуал. пробл. современной онкологии. — 1991. — №9. — С.138-141.
2. Балицкий К.П., Воронцова А.Л. Лекарственные растения и рак. - К.: Наук. думка, 1982. - 376 с.
3. Haque N., Chowdhury S.A.R., Nutan M.T.H et al. Evaluation of antitumor activity of some medicinal plants

Таблица

### Цитотоксическая активность суммы лейкоантоцианидинов и катехинов

Объекты исследования	Количество погибших клеток, %	
	до облучения лазером	после облучения лазером
контроль	2.42 ± 0.3	2.5 ± 0.3
контроль после инкубации в термостате	2.5 ± 0,25	2.5 ± 0.25
<i>Сумма 1</i>		
200 мкг/мл	60.5 ± 2.5	90.5 ± 2.5
20 мкг/мл	15.5 ± 1.5	90.5 ± 2.5
2 мкг/мл	7.4 ± 0.6	75.5 ± 2.5
0.2 мкг/мл	2.2 ± 0.5	53.5 ± 2.5
<i>Сумма 2</i>		
200 мкг/мл	65.5 ± 2.5	95.5 ± 2.5
20 мкг/мл	60.5 ± 2.5	90.5 ± 2.5
2 мкг/мл	4.5 ± 1.5	93.5 ± 2.5
0.2 мкг/мл	1.2 ± 1.5	90.5 ± 2.0
<i>Сумма 3</i>		
200 мкг/мл	60.5 ± 2.0	93.5 ± 2.5
20 мкг/мл	20.5 ± 2.5	99.5 ± 2.5
2 мкг/мл	6.4 ± 0.6	85.5 ± 2.0
0.2 мкг/мл	1.2 ± 0.5	63.5 ± 2.0

- of Bangladesh by potato disk bioassay // *Fitoterapia*. — 2000. - Vol. 71. — P. 547-552.
4. Лавренова Г.В. Фитотерапия. Т. 2. — СПб: ООО «СМИО-Пресс», ТОО «Диамант», 1996. — 480 с.
5. Аколов И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение. — Т.: Медицина, 1986. — 567 с.
6. Saenz, M.T., Ahumada, M.C., Garcia, M.D. Extracts from *Viscum* and *Crataegus* are cytotoxic against Larynx cancer cells // *Zeitschrift Naturforsch [C]*. — 1997. — Vol. 52. — P. 42-44.
7. Siegers, C.P., Steffen, B., Robke, A., Pentz, R., The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation // *Phytomedicine*. — 1999. — № 6. — P. 7-11.
8. Mohammed S. Ali-Shtayah, Zohara Yaniv, Jamal Mahajna. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal Plants // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2000. — Vol. 73. — P. 221-232.
9. Музычкина Р.А. Природные антрахиноны. Биологические свойства и физико-химические характеристики. Под ред. акад. Г.А. Толстикова. — М.: Фазис, 1998. — 864 с.
10. Романюк О.І., Бензель Л.В. Біологічно активні речовини рослин роду щавель та їх медичне застосування // *Фармац. журн.* — 1997. - № 5. — С. 29-37.
11. Музычкина Р.А. Щавели — источник БАВ и фитопрепаратов // Четверта міжнародна конференція з медичної ботаніки: Тези доп. — Київ, 1997. — С. 415-416.
12. Ареалы лекарственных и родственных им растений СССР (Атлас). Под ред. В.М. Шмида. 2-е изд., испр. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. - С. 36-39.
13. Журавльов М.С., Ковальов В.М., Абу Захер Кхалед. Антрахінони деяких видів роду щавель // *Фізіологічно активні речовини*. — 2000. - № 1(29). — С. 79-81.
14. Журавльов М.С., Абу Захер Кхалед, Ковальов С.В. Вивчення біологічно активних речовин представників роду щавель // *Вісник фармації*. — 2000. - № 4(24). — С. 14-17.
15. Абу Захер Кхалед, Ковальов В.М., Журавльов М.С. Флавоноли та оксикоричні кислоти деяких видів рослин роду щавель // *Фізіологічно активні речовини*. — 2000. - № 2(30). — С. 101-103.
16. Абу Захер Кхалед, Журавлев Н.С. Аминокислотный состав некоторых видов растений рода *Rumex L.* // *Провизор*. — 2001. - № 21. — С. 23-24.
17. Абу Захер Кхалед, Н.С. Журавлев, Л.И. Белостоцкая, О.Н. Гомон. Антиокислительная активность суммы лейкоантоцианидинов и катехинов, выделенных из подземных органов видов рода *Rumex L.* // *Фармаком*. — 2001. - № 2. — С. 77-81.
18. Абу Захер Кхалед, Журавлев Н.С., Деримедведь Л.В. Фармакологическое изучение антиоксидантных и мембраностабилизирующих свойств суммы катехинов и лейкоантоцианидинов // *Вісник фармації (Спецвыпуск)*. — 2001. - № 3(27). — С. 170.
19. Чернов В. А. Влияние препаратов омелы на метастазирование кроличьей опухоли Брауна-Пирс // *Вопросы онкологии*. - 1955. - Т. 1, № 4. - с. 38-48.
20. Berlin K., Jain R.K., Richert C. Are porphyrin mixtures favorable photodynamic anticancer drugs? A model study with combinatorial libraries of tetraphenylporphyrins // *Biotechnol. Bioeng.* - 1998 - Vol.61, №2. — P. 107-118.

#### Резюме

Абу Захер Кхалед, Журавльов М.С., Мартинов А.В.

#### Вивчення фотодинамічної протипухлинної активності суми катехинів і лейкоантоціанідинів видів роду щавель

Вивчена фотодинамічна протипухлинна активність суми катехинів і лейкоантоціанідинів, виділених із підземних органів щавлів зубчастого, красивого та пірамідального. Результати фармакологічного експерименту показують, що досліджувані суми мають протипухлинну активність по відношенню до культур асцитної форми рака Ерліха. Це дозволяє вважати їх перспективними для створення нових лікарських засобів протипухлинної дії.

#### Summary

Abu Zakher Khaled, N.S. Zhuravlyov, A.V. Martinov

#### Study of antitumoral photodynamic activity of the sum of catechins and leucoanthocyanidins species of rumex genus

It has been studied the antitumoral photodynamic action of the sum of catechins and leucoanthocyanidins obtained from the underground organs of *Rumex dentatus*, *Rumex pulcher* and *Rumex thyrsoiflorus*. The results of pharmacological experiment show that the sums studied possess the antitumoral activity with respect to Erlich cancer ascites form. It allows to consider those as perspective ones to produce the new phytotherapies with antitumoral activity.

**Абу Захер Кхалед** (р. 1971). Окончил Украинскую фармацевтическую академию (1998). Аспирант кафедры фармакогнозии Национальной фармацевтической академии Украины (1998).

**Журавлев Николай Семенович** (р. 1936). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1964). Канд. фарм. наук (1970). Доцент кафедры фармакогнозии Национальной фармацевтической академии Украины (1980).

**Мартинов Артур Викторович** (р. 1973). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1995). Канд. фарм. наук (1997). Ст. науч. сотрудник (2000). Ученый секретарь института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины.

### **Завод по выпуску фармацевтических субстанций**

Для реализации новых технологий и производства субстанций в соответствии с международными нормами под руководством ООО «ФАРМСИНТЕЗ» строится новый завод в пригороде Санкт-Петербурга. Завод спроектирован и строится с участием ведущих зарубежных и российских компаний. В настоящее время завершается монтаж уникального технологического оборудования.

Проектная мощность завода - до 20 тонн субстанций в год.

Площадь занимаемой территории - 5 га.

На первом этапе планируется выпуск 10 видов химических субстанций. В дальнейшем планируется освоить производство до 50 видов субстанций.

Завод по производству субстанций в Петербурге будет первым в России и одним из немногих в мире фармакологическим производством, построенным по модульному принципу. Модульный принцип позволяет осуществлять переналадку оборудования на выпуск субстанции требуемого вида в течение нескольких часов. Эта технологическая схема нова не только для России, но и для Запада.

[Производственная база ФАРМАВИТА  
ООО «ФАРМСИНТЕЗ»]

### **Компания «Солвей Фарма» представляет новую современную таблетированную форму препарата Бетасерк, содержащую 16 мг бетагистина дигидрохлорида**

В настоящее время компания «Солвей Фарма» представляет на фармацевтическом рынке России новую современную таблетированную форму препарата Бетасерк, содержащую 16 мг бетагистина дигидрохлорида. Новая форма выпуска препарата Бетасерк более удобна в применении, чем форма, содержащая 8 мг бетагистина. Схема назначения препарата Бетасерк, содержащего 16 мг бетагистина дигидрохлорида - 1 таблетка 3 раза в день. Более удобная форма приема препарата Бетасерк, 16 мг, обеспечивает более высокую приемлемость терапии, что в целом повышает эффективность назначенного курса лечения. Бетасерк является оригинальным антагонистом H3-гистаминовых рецепторов, расположенных на пресинаптической

кой мембране, и имеет комплексный механизм действия. Помимо периферического действия (улучшения микроциркуляции и регионального кровотока в области внутреннего уха), Бетасерк обладает центральным действием - нормализует процессы возбуждения нейронов вестибулярных ядер, расположенных в продолговатом мозге. Бетасерк отличается от всех традиционно используемых препаратов для лечения вертиго тем, что воздействует на патогенетические механизмы головокружения и не вызывает седации, экстрапиримидных расстройств, не влияет на системное артериальное давление. Бетасерк обладает высокой эффективностью и хорошей переносимостью. Назначение новой формы препарата Бетасерк, содержащей 16 мг бетагистина дигидрохлорида, по 1 таблетке 3 раза в день обеспечивает эффективное лечение головокружения, хорошее самочувствие пациентов и быстрое восстановление работоспособности.

[<http://www.solvay.pharma.ru>]

### **Компания «Солвей Фарма» переходит к выпуску новой микронизированной формы препарата Дюфастон.**

Введение дополнительного высокотехнологического процесса микронизации препарата Дюфастон обеспечивает получение мелкодисперсных гранул, которые содержат активное вещество и заключены в специальную оболочку.

Благодаря этому новая микронизированная форма препарата Дюфастон обладает лучшей абсорбцией и имеет меньший размер таблетки. Таким образом, микронизированный Дюфастон обладает быстрым эффектом после перорального приема и более удобен для пациенток.

Являясь пространственным изомером натурального прогестерона, Дюфастон отличается высокой терапевтической активностью, лишен андрогенных, минералокортикоидных свойств, хорошо переносится, безопасен для матери и плода и показан во всех случаях недостаточности эндогенного прогестерона, включая бесплодие и невынашивание беременности, нарушения менструального цикла, эндометриоз, предменструальный синдром и дисменорею, заместительную гормональную терапию.

[<http://www.solvay.pharma.ru>]

**В 2002 году фармацевтическая компания «Солвей Фарма» выводит на рынок препарат Креон 10 000, минимикросферы, который заменит ныне существующий препарат Креон 8 000, микросферы.**

Более 100 лет компания «Солвей Фарма» совершенствует производство ферментных препаратов поджелудочной железы. Первый патент на технологию производства был выдан еще в 1900 году. Сегодня компания представляет на фармацевтическом рынке IV-е поколение ферментных препаратов, содержащих минимикросферы - Креон 10 000, минимикросферы.

Клиническая эффективность ферментных препаратов поджелудочной железы на данном этапе развития технологии определяется лекарственной формой препарата, что и привело к созданию особого микрогранулированного препарата панкреатина - Креон 10 000, минимикросферы.

Именно современная лекарственная форма выгодно отличает препарат Креон 10 000, минимикросферы от аналогичных препаратов. К преимуществам препарата относят:

1. Оптимальный размер минимикросфер.
2. Кислотоустойчивость минимикросфер.
3. Высокую скорость высвобождения ферментов.
4. Оптимальное сочетание липазы и колипазы.
5. Безопасность.

Таким образом, препарат Креон 10 000, минимикросферы, имеет микрогранулированную лекарственную форму, обеспечивающую идеальную фармакокинетику препарата. Размер желатиновой капсулы Креона 10 000, содержащего минимикросферы, на 50 % меньше, чем у Креона 8 000, при этом эффективность препарата увеличилась примерно на 25 %, что стало возможным благодаря внедрению новой технологии экстракции панкреатина и его измельчения до минимикросфер диаметром 0.7 - 1.25 мм. Устойчивая к воздействию желудочного сока оболочка минимикросфер позволяет сохранять 98 % активности ферментов при воздействии кислоты в течение 2-х часов.

Высокая терапевтическая эффективность препарата Креон 10 000 достигается за счет широкого распределения минимикросфер в желудочном содержимом и одновременного поступления вместе с химусом в 12-перстную

кишку. Препарат обеспечивает быстрое высвобождение более 90 % ферментов в течение 45 минут при pH 5.5 и выше, в чем превосходит другие аналоги. Препарат Креон 10 000, минимикросферы, имеет оптимальное сочетание колипазы и липазы, равное 1.9, что показывает высокую активность ферментной липазы в препарате.

Кроме того, растворимая в кишечнике оболочка минимикросфер Креон не содержит сополимера метакриловой кислоты, играющего ключевую роль в развитии таких осложнений, как фиброзная колонопатия.

Благодаря оптимальной научной формуле и высокой эффективности, Креон является признанным лидером среди ферментных заместительных препаратов и занимает первое место в мире по объему продаж в своей группе.

Креон показан к применению при всех состояниях, сопровождающихся нарушением пищеварения при экзокринной недостаточности поджелудочной железы: хронические панкреатиты, гастроэктомия, заболевания печени, синдром Швахмана, опухоли поджелудочной железы и фатерова сосочка, наследственные и алкогольные панкреатиты.

Креон 10 000, минимикросферы, является безопасным препаратом и назначается различным группам пациентов, независимо от пола и возраста.

Препараты Креон 10 000 и 25 000 позволили достичь значительного прогресса в лечении больных муковисцидозом или перенесших панкреатотомию.

<http://www.solvaypharma.ru>

#### **Испытывается новое средство от атеросклероза**

Вакцина от атеросклероза - одной из самых страшных болезней последнего времени - может поступить в распоряжение врачей уже через несколько лет. В настоящий момент американские ученые из лос-анджелесского медицинского центра Сидерс-Синай (Cedars-Sinai) совместно со шведскими коллегами успешно опробовали разработку на мышцах с генетически обусловленным высоким уровнем холестерина в крови. Оказалось, что у получивших экспериментальную вакцину мышцей на стенках сосудов откладывалось на 70 процентов меньше холестериновых бляшек. Вакцина нацеливает иммунную

## • НОВИНИ СВІТОВОЇ ФАРМАЦІЇ • НОВИНИ СВІТОВОЇ ФАРМАЦІЇ •

систему на частицы, в составе которых в крови циркулирует «плохой» холестерин, точнее, на белки в составе этих частиц. Их синтетические аналоги в сочетании с квасцами для активирования иммунной системы вводятся в кровь. По данным исследователей, синтез компонентов вакцины в условиях лаборатории не представляет серьезных трудностей, и испытания на добровольцах могут начаться в течение двух-трех лет. Результаты исследования были представлены на ежегодном съезде Американского колледжа кардиологии, который проходит в Атланте.

BBC News

### Разработано действенное средство против гриппа

Открыто новое средство против гриппа, которое может использоваться как для лечения, так и для профилактики. Препарат разработан компаниями «Биота» (Biota) и «Глаксо Смит Кляйн» (GlaxoSmithKline) и был представлен на 15 Международной конференции по противовирусным средствам, которая прошла 20 марта в Праге.

Представители компании «Биота» утверждают, что новый препарат намного опережает все существующие противовирусные лекарства, так как его достаточно принимать один раз в неделю для профилактики гриппа; для лечения также достаточно одного приема в день. Эксперименты на животных выявили высокую эффективность нового средства.

Технология «Флунет» (FLUNET) использовалась для создания нового вида ингибиторов нейраминидазы, которые могли бы задерживаться в стенках дыхательных путей на такой срок, чтобы препарат достаточно было вводить один раз в неделю для профилактики, или один раз в день для лечения гриппа.

Вслед за этим, в лабораториях компании «Глаксо Смит Кляйн» было синтезировано большое количество вариантов молекулы занамивира (использующегося в настоящее время ингибитора нейраминидазы). Исследуя затем активность полученных молекул против вирусов гриппа типов 1 и 2, ученые выделили те из них, которые ингибировали нейраминидазу в сотни раз эффективнее, чем существующие препараты.

Исследования динамики этих молекул в эксперименте на животных показали, что при однократном введении концентрация в

легких составляла около 10000 нг/г, что достаточно для того, чтобы эффективно защищать от вирусов гриппа. В том же тесте, занамивир показал намного более скромные результаты, его концентрация составила всего 20 нг/г.

В другом исследовании, в котором проводилось лечение занамивиром (два приема в день) и экспериментальным препаратом (однократно в день, в дозах 0.1 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг), был выявлен значительно лучший эффект последнего.

В настоящее время «Биота» проводит поиск наиболее активных молекул, которые лягут в основу производства нового препарата. Биота является единственным обладателем ингибиторов нейраминидазы «Флунет» и в настоящее время ищет партнеров для развития технологии.

[<http://www.lenta.ru/health>]

### Обнаружено, что анальгетики защищают от рака простаты

Исследователи из Клиники Мэйо (США) сообщили, что регулярный прием аспирина, ибупрофена и других широко распространенных обезболивающих препаратов может предотвращать рак простаты, особенно у пожилых пациентов.

Эти лекарства относятся к группе, известной как «нестероидные противовоспалительные средства» (НПВС).

Мужчины старше 60 лет, которые ежедневно принимают эти лекарства, в два раза реже болеют раком простаты, который занимает второе место в структуре смертности от злокачественных опухолей в США. Ожидается, что только за ближайший год от этой болезни в США погибнет около 30 000 человек.

В исследовании, которое продолжалось пять с половиной лет в штате Миннесота, было задействовано 1362 мужчины европеоидной расы. Среди тех, кто принимал обезболивающие препараты, рак простаты развился у 4 %, в то время, как у не принимавших он составил 9%. Исследование показало, что защитное действие этих препаратов проявляется тем сильнее, чем старше пациенты.

Однако, Розбад Робертс (Rosebud Roberts), проводивший исследование в Клинике Мейо, заявил, что эти результаты еще требуют тщательной проверки. «Мы должны определить, какие дозировки этих лекарств обладают за-

щитным действием против рака простаты, а также выяснить биологические механизмы воздействия НПВС на рак простаты», - сказал Робертс. Он добавил, что уже проводились исследования, которые выявили способность этих препаратов предотвращать злокачественные новообразования молочной железы.

Важно то обстоятельство, что НПВС имеют при постоянном приеме ряд побочных эффектов, главным из которых является развитие язвы желудка и/или двенадцатиперстной кишки.

Настоящее исследование является частью более крупномасштабного поиска и касается исключительно мужчин европеоидной расы. В то же время известно, что у американцев негроидной расы рак простаты возникает чаще. Робертс сказал по этому поводу, что «необходимо провести дополнительное исследование с целью выяснить, применимы ли наши результаты в этой группе».

[<http://www.lenta.ru/health>]

#### **Одна инъекция нового лекарства излечивает остеопороз**

Новое лекарство от остеопороза достаточно вводить один раз в год, чтобы остановить развитие болезни. Это было доказано в ходе международного исследования, результаты которого были опубликованы в медицинском журнале «Новая Англия». Открытие может ознаменовать собой прорыв в лечении остеопороза, которым страдают десять миллионов пожилых американцев, так как отпадает необходимость постоянного приема других лекарств.

Группа исследователей, возглавляемая доктором Яном Ридом (Ian Reid) в Оклендском университете (Новая Зеландия), обнаружила, что одна инъекция 4 мг золедроновой кислоты в год лечит остеопороз не хуже, чем ежедневный прием общепринятых лекарств.

Однако, настоящее исследование не ответило на один из ключевых вопросов: предотвращает ли новый вид лечения переломы костей. Ответить на него позволят дальнейшие поиски, рассчитанные на три года.

Золедроновая кислота, или золедронат, продается под названием «Зомета» швейцарской компанией «Новартис АГ» (Novartis AG), оплачивающей исследования. Препарат не был одобрен для лечения остеопороза. В основном он предназначается для снижения

высокого уровня кальция в крови людей, больных злокачественными новообразованиями. На прошлой неделе Управление по пищевым продуктам и лекарствам США (U.S. Food and Drug Administration, FDA) разрешило применять это лекарство и в лечении некоторых злокачественных новообразований, поражающих кости.

Многие больные остеопорозом не лечатся от него в силу расстройств пищеварения - побочных эффектов общепринятых лекарств. Этим и обусловлена необходимость новых видов лечения. Доктор Рид сказал, что он и его коллеги были потрясены, когда увидели столь долгосрочный эффект нового препарата. Он добавил, что «на протяжении двенадцати месяцев после инъекции 4 мг лекарства, его действие ничуть не ослабевало. Напротив, плотность костного вещества только увеличивалась, а также замедлялся распад старой костной ткани».

[[www.lenta.ru/health](http://www.lenta.ru/health)]

#### **США: от рака вылечит хорошее настроение**

Ученые обнаружили, что химический элемент, который обеспечивает хорошее настроение, также побуждает раковые клетки самоуничтожаться. Ученые заметили, что при помещении серотонина в одну пробирку с клетками центральноафриканской лимфомы, последние «убивают» себя. Руководитель исследования профессор Гордон говорит: «Серотонин - натуральный химический элемент, который вырабатывается организмом и регулирует настроение. Избыток серотонина обычно влияет на сон и аппетит. Нам удалось выяснить, что этот элемент обладает прекрасной способностью приказывать некоторым другим клеткам самоуничтожаться». Сейчас ученые работают над изобретением метода лечения рака на основе этого феномена. Отчет об исследовании был напечатан в американском журнале «Blood».

«Blood»

[[Likar-info.com](http://Likar-info.com)]

#### **Лондон: новые таблетки от ожирения «обманывают» мышцы**

Ученые изобрели таблетки, которые «обманывают» организм, заставляя его думать, что мышцы тела активно работают. А на самом деле человек может лежать на диване и спокойно смотреть телевизор.

Этот препарат разработан как возможное средство лечения ожирения и диабета. Процесс сбрасывания жира в организме, открытый учеными из британского университета Данди, теперь используется для создания нового поколения лекарств от ожирения. На сегодняшний день существует способ лечения диабета, базирующийся на принципе «обмана» организма, однако до настоящего момента ученые до конца не понимали, каким образом действуют препараты. Протеинкиназные реакции (АМРК) дают команду мышцам сжигать углевод и жиры, а также предотвращают их повторное появление в жировых тканях. Считается, что этот процесс, который в нормальных условиях является следствием физической нагрузки на мышцы, помогает бороться с простым и диабетическим ожирением.

Профессор Грэм Харди из университета Дэнди вместе с фармацевтическими компаниями разрабатывает новое поколение АМРК-активированных препаратов, эффективность которых превзойдет существующие лекарства. «Мы обнаружили, что система АМРК активируется в клетках в тот момент, когда у них не хватает энергии, и она приводит в действие механизм метаболизма глюкозы и жира, - заявил профессор. — Естественно, лучший способ не набрать лишнего веса — это правильное питание и умеренные физические нагрузки, и тогда все будет в порядке. Но, например, пожилые люди не всегда могут делать зарядку, соответственно, они быстро поправляются, и лекарства, активирующие АМРК, станут для них прекрасной альтернативой».

[top.rbc.ru]

**Плавикс (клопидогрель) - препарат, препятствующий адгезии тромбоцитов, был рекомендован FDA США для лечения острого коронарного синдрома. Плавикс впервые был использован в 1997 году у больных со стенокардией напряжения, инсультом или заболеваниями периферических артерий. Препарат произведён «Bristol-Myers Squibb» и «Sanofi-Synthelabo»**

Плавикс, который ингибирует агрегацию тромбоцитов, обычно назначается в дополнение к аспирину. Было показано достоверное снижение неблагоприятных сердечно-сосудистых состояний у больных со стенокарди-

ей напряжения или инсультом. Теперь Плавикс рекомендован к использованию у пациентов с нестабильной стенокардией или инфарктом миокарда.

Для получения одобрения FDA «Bristol-Myers» приведены данные исследования CURE, опубликованные в августе 2001 г. Было показано, что Плавикс снижает риск развития приступов стенокардии, инсультов или смерти от сердечно-сосудистых заболеваний на 20 % по сравнению с плацебо.

Однако руководитель American Heart Association's Sidney Smith считает, что подобные рекомендации несколько преждевременны и требуют уточнения. В настоящий момент разрабатываются показания к применению клопидогреля, других антагонистов P2-3 рецепторов, гепарина и низкомолекулярных гепаринов. Эти рекомендации планируются выпустить через несколько месяцев.

«New England Journal of Medicine»

**Недавно в странах Европы на прилавках аптек появился новый препарат Propecia, который, как утверждается, станет настоящим спасением для мужчин, предрасположенных к облысению**

По заявлениям медиков, прием одной такой таблетки в день может полностью остановить процесс выпадения волос на голове, тогда как увеличение дозы в два-три раза может даже стимулировать повторный рост шевелюры. Клинические испытания, проведенные в Королевской больнице Хэлламшир в Шеффилде (Великобритания) с участием 1879 добровольцев, показали, что регулярное применение препарата в течение года в 83 % случаев полностью останавливает процесс облысения, а в 66 % случаев выпавшие волосы начинают отрастать заново. Лечебный эффект нового средства основан на подавлении действия фермента, который превращает мужской гормон тестостерон в дигидротестостерон - вещество, повреждающее структуру волосяной луковицы. Расчетный курс лечения составляет полгода, тогда как результаты становятся видны уже через два месяца. Цена упаковки Propecia, которой хватит приблизительно на тридцать дней, составляет 50 долларов США.

[www.lenta.ru/health]