

Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України*Леонтьєв Д.А., Гризодуб О.І., Підпружников Ю.В., Іванов Л.В.*

Фармакопейні аспекти методики визначення молекулярно-масового розподілу в субстанції декстран 40 і готовому лікарському препараті «Реополіглюкін» 3

Аналітичний огляд*Куліков А.Ю., Логінова Л.П., Самохіна Л.В.*

Міцелярна рідинна хроматографія у фармацевтичному аналізі та інших областях аналізу (огляд) 22

Аммосов О.С., Литвиненко В.І.

Солодка: технологія препаратів (стислий огляд) 53

Литвиненко В.І., Бубенчиков Р.О., Попова Н.В.

Фіалка триколірна та фіалка польова: хімічний склад та застосування 62

Стандартизація лікарських засобів*Зинченко О.А., Котова Е.Е., Чибіляєв Т.Х.*

Визначення залишкових кількостей води в ліофілізованих лікарських препаратах методом газової хроматографії 66

Харченко О.В., Шеїн А.Т., Морозюк А.В.

Контроль якості препаратів на основі L-аргініну L-глутамату 72

Фітохімічні дослідження*Борогіна Н.В., Ковальов В.М.*Кількісне визначення фенольних сполук *Populus tremula* L. 75**Готові лікарські засоби***Андрюкова Л.М.*

Первинна упаковка офтальмологічних розчинів: матеріали, що використовуються для виробництва контейнерів, і фармацевтична розробка 78

Фармакологічні дослідження*Хохленкова Н.В., Лібіна В.В., Резниченко А.А.*

Фармакокінетичне дослідження мазі «Пролідоксид» 84

Коритнюк Р.С., Давтян Л.А., Коритнюк О.Я., Серєда П.І.

Визначення фармакокінетичних параметрів лікарських плівок «Віруспен» у крові щурів 89

Техніко-економічні та маркетингові дослідження*Півень О.П., Діхтярьов С.І.*

Розробка наукових підходів до оцінки конкурентоспроможності технологій виробництва лікарських засобів 93

-
- Заст. головного редактора Спиридонов В.М. (д.фарм.н, професор)
 - Рецензенти: д.фарм.н., професор, чл.-кор. НАНУ Георгієвський В.П.; Коваленко А.І.; к.б.н. Лібіна В.В.; к.фарм.н. Резниченко А.А.; к.х.н. Рибаченко А.І.; к.мед.н. Чайка Л.О.; Шеїн А.Т.
 - Випуск підготували Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Нестеренко Л.А.
 - Рекомендований до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 2 від 09.03.2004 р.
 - Підписаний до друку 18.03.2004 р. Тираж 500 прим.
-

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Подпружников Ю.В., Иванов Л.В.

Фармакопейные аспекты методики определения молекулярно-массового распределения в субстанции декстран 40 и готовом лекарственном препарате «Реополиглюкин» 3

Аналитический обзор

Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В.

Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе и других областях анализа (обзор) 22

Аммосов А.С., Литвиненко В.И.

Солодка: технология препаратов (краткий обзор) 53

Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А., Попова Н.В.

Фиалка трехцветная и фиалка полевая: химический состав и применение 62

Стандартизация лекарственных средств

Зинченко А.А., Котова Э.Э., Чибилев Т.Х.

Определение остаточных количеств воды в лиофилизированных лекарственных препаратах методом газовой хроматографии 66

Харченко О.В., Шейн А.Т., Морозюк А.В.

Контроль качества препаратов на основе L-аргинина L-глутамата 72

Фитохимические исследования

Бородина Н.В., Ковалев В.Н.

Количественное определение фенольных соединений *Populus tremula* L. 75

Готовые лекарственные средства

Андрюкова Л.Н.

Первичная упаковка офтальмологических растворов: материалы, используемые для производства контейнеров, и фармацевтическая разработка 78

Фармакологические исследования

Хохленкова Н.В., Либина В.В., Резниченко А.А.

Фармакокинетическое исследование мази «Пролидоксид» 84

Корытнюк Р.С., Давтян Л.А., Корытнюк А.Я., Серега П.И.

Определение фармакокинетических параметров лекарственных пленок «Вируплен» в крови крыс 89

Технико-экономические и маркетинговые исследования

Пивень Е.П., Духтярев С.И.

Разработка научных подходов к оценке конкурентоспособности технологий производства лекарственных средств 93

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 543.544.615.01

Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Подпружников Ю.В., Иванов Л.В.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Государственная служба лекарственных средств и изделий медицинского назначения

Фармакопейные аспекты методики определения молекулярно-массового распределения в субстанции декстран 40 и готовом лекарственном препарате «Реополиглюкин»

В рамках разработки Государственной Фармакопеи Украины проведен систематический анализ проблем, возникающих при применении жидкостно-хроматографической методики контроля молекулярно-массового распределения декстранов, описанной в Европейской Фармакопее, и даны рекомендации по ее уточнению для включения в национальную часть статьи 2.2.39. «Молекулярно-массовое распределение декстранов» Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины. На основе полученных рекомендаций разработана методика контроля молекулярно-массового распределения субстанции декстран 40 и препаратов на его основе, которая была воспроизведена на различных типах хроматографических систем. Проведен анализ и аттестация *ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы*. Предложена методическая основа проведения валидации методики контроля молекулярно-массового распределения препаратов декстрана 40, которая апробирована на примере аттестации *ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы* и может быть использована в других лабораториях, контролирующих качество этих препаратов.

Инфузионный препарат «Реополиглюкин» представляет собой 10 % раствор декстрана 40 в 0,9 % растворе натрия хлорида и широко применяется в качестве плазмозамещающего и дезинтоксикационного средства [1].

Одной из важнейших характеристик качества декстрана 40 и, соответственно, препарата «Реополиглюкин» является молекулярно-массовое распределение (ММР). Учитывая, что при инфузиях парентерально вводится до 1500 мл реополиглюкина (т.е. до 150 г декстрана 40) [1], вопросы контроля данного показателя являются очень актуальными и им уделяется самое серьезное внимание со стороны контролирующих органов. В частности, 24 июля 2003 года Государственной инспекцией по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины было проведено Сопещание по вопросам контроля ММР в субстанции и готовом продукте [2] с участием представителей аккредитованных лабораторий и производителя субстанции (фирмы «Биотика АО»). Данное Сопещание выявило наличие серьезных проблем в контроле качества субстанции декстран 40 и препарата «Реополиглюкин», а также различие в подходах к контролю ММР среди специалистов. Было также констатировано, что действующие аналитические нормативные документы (АНД) нуждаются в доработке и пересмотре, поскольку контроль ММР специалистами давно уже проводится по видоизмененным

методикам. Одновременно выявились проблемы и с применением методик Европейской Фармакопеи к контролю качества субстанции и препаратов декстрана 40.

О том, насколько проблема контроля ММР является важной для полимерных плазмозамещающих инфузионных лекарственных средств, можно судить по препарату «Гемодез» [3], который был снят с регистрации в значительной степени из-за несоответствия его ММР необходимым требованиям.

Поэтому Сопещание инициировало широкую научную дискуссию по общим проблемам обоснованности методик контроля ММР в отечественных АНД [2, 4, 5, 6]. В рамках этой дискуссии была предпринята попытка рассмотреть с теоретических позиций недостатки действующих АНД (ВФС 42У-105-1213-99 «Декстран 40» и ВФС 42У-105-1441-99 «Реополиглюкин») и предложено приостановить их действие и действие всех других АНД, основанных на них [4].

Корректность высказанных авторами [4] положений проверить достаточно трудно, поскольку они носят, в значительной степени, публицистический характер [4, 6] и не подкрепляются каким-либо экспериментальным материалом [4, 5, 6]. Кроме того, они относятся к неопубликованным работам (которые потому и не опубликованы, что не являются законченными), а также к АНД [4], которые, как было отмечено на Сопещании [2], давно уже фактически не используются при конт-

роле качества декстрана 40 и препарата «Репополиглюкин». В то же время, авторы [4], впервые в отечественной научной литературе, подняли вопрос об обоснованности методик контроля ММР в действующих АНД на препараты декстрана 40. В дальнейшем [5] авторы подняли вопрос о некорректности некоторых положений методики Европейской Фармакопеи (ЕФ) контроля ММР (в частности, калибровки) и о необходимости ее пересмотра. Было также высказано мнение [6] о некорректности используемого в Украине фармакопейного стандартного образца (ФСО) декстрана для проверки пригодности системы при контроле ММР декстрана 40.

Как видно, в статьях [2, 4, 5, 6] поднимается широкий круг вопросов, связанный с контролем ММР субстанции декстрана 40 и готовых лекарственных средств на его основе. Основные вопросы можно сформулировать следующим образом:

1. Почему возникают проблемы при применении методики в декстране 40 [7, 8]?
2. Какие модификации в методике ЕФ контроля ММР можно считать несущественными, а какие противоречат подходу ЕФ?
3. Какова максимально допустимая неопределенность методики контроля ММР?
4. С какой точностью надо представлять результаты определения ММР (проблема округления)?
5. Какая должна быть неопределенность приписного значения ФСО декстрана для проверки пригодности системы при контроле ММР декстрана 40?

Отметим, что большинство данных вопросов связано с трудностью валидации методик контроля ММР в субстанции и препаратах декстрана 40, которая не обсуждалась в отечественной научной литературе, а сама валидация методик контроля ММР в АНД не проводилась, что является главной причиной разногласий специалистов по вопросам обоснованности этих методик. В значительной степени, это объясняется тем, что большинство методик контроля ММР было разработано и внесено в АНД до введения в действие (1.04.2002.) Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ), которая требует обязательной валидации всех методик анализа, включаемых в АНД, и приводит основные принципы валидации [9]. После введения в действие ГФУ ситуация изменилась, и были предприняты попытки по проведению валидации методики контроля ММР. При этом выявились значительные трудности, связанные со спе-

цификой применения принципов валидации к данной методике, которая является, по-видимому, самой сложной хроматографической методикой контроля качества лекарственных средств.

В настоящее время происходят интенсивные процессы в сфере перехода отечественных предприятий на требования GMP, которые в Украине полностью эквивалентны европейским. На протяжении прошлого года семь производственных участков на пяти предприятиях прошли сертификацию и получили национальные сертификаты GMP. Одним из обязательных условий такого перехода является валидация методик анализа. В то же время, критерии такой валидации для контроля ММР в декстранах и их препаратах до последнего времени были совершенно неясны. Актуальность поднятой проблемы возрастает с учетом того, что в Украине утверждён нормативно-правовой акт [10], который создает цивилизованные технические и правовые основы проведения аккредитации и аттестации лабораторий по контролю качества лекарственных средств. Излишне говорить очевидные вещи о том, что указанного документа давно уже ждали специалисты, работающие в сфере контроля качества медикаментов, в том числе, государственного контроля. Предполагается, что аттестация (аккредитация) лабораторий будет необходимым условием для сертификации предприятий на соответствие требованиям GMP. Необходимость этого проистекает из того, что за рубежом, в отличие от Украины, лабораторный контроль является лицензируемым видом деятельности. Поскольку изменение законодательной базы в Украине является процессом мало прогнозируемым, надеяться ввести то же требование на законодательном уровне не приходится. Поэтому требование проведения аккредитации (аттестации) лабораторий как обязательное, предшествующее сертификации по GMP, является логичным и в данной ситуации максимально приближает отечественные реалии к отработанной во всем мире практике. В соответствии с [10] лаборатория, подающая заявку на проведение аттестации (аккредитации), должна указать сферу аттестации (аккредитации) и в ходе обязательной проверки доказать свою техническую компетентность в этой сфере. Таким образом, настоящая статья может быть полезна также контрольным лабораториям для создания методической основы построения алгоритмов валидации анализа субстанции декстрана 40 и препаратов на его основе.

Сложность и неоднозначность (как будет показано ниже) методики определения ММР в ЕФ является причиной того, что этот метод до сих пор не был включен в Государственную Фармакопею Украины (ГФУ). Поскольку данный вопрос давно уже требует фармакопейного решения, и накоплен определенный опыт контроля ММР в декстранах, актуальным является систематический анализ и решение вышеуказанных проблем с точки зрения принципов стандартизации с целью включения контроля ММР в декстранах и их препаратах в Дополнение к ГФУ.

1. Подход Европейской Фармакопеи к контролю ММР декстрана 40

Требования к качеству субстанции декстран 40 регламентируются монографией ЕФ «Декстран 40 для инъекций» [7]. Само же определение проводится с помощью эксклюзивной хроматографии и регламентируется требованиями общей статьи 2.2.39 «Молекулярно-массовое распределение в декстранах» [8], принципы которой остаются неизменными, по меньшей мере, с 1997 года.

1.1. Условия хроматографирования

- колонка размером 0.3 м · 10 мм с поперечно-сшитой агарозой для хроматографии Р или несколько колонок размером 0.3 м · 10 мм с полиэфирным гидроксилированным гелем для хроматографии Р;
- подвижная фаза: 7 г натрия сульфата безводного Р и 1 г хлорбутанола Р в 1 л воды Р; скорость 0.5 — 1 мл/мин с вариацией не более ± 1 % в час;
- детектор — дифференциальный рефрактометр;
- объем пробы — 100-200 мкл; анализируемые пробы растворяют в подвижной фазе;
- температура системы должна поддерживаться с точностью ± 0.1 °С.

1.2. Калибровка

Стандартные образцы: как маркер нулевого объема (V_o) используется *EP CRS декстран V_o* ; для калибровки используются *EP CRS декстраны для калибровки 4, 10, 40, 70 и 250*, а также *глюкоза Р* как маркер полного объема (V_i).

Диапазон молекулярных масс при калибровке: 4 000 — 250 000 у.е. для декстранов, а также глюкоза (180 у.е.).

Хроматограмма каждого калибровочного декстрана разбивается на секции ($p \geq 60$), характеризующие молекулярной массой M_i , высотой y_i и коэффициентом распределения:

$$K_i = \frac{V_i - V_o}{V_i - V_o} \tag{1}$$

Разрешается использование графической (ручной) оптимизации (очень трудоемкой) с помощью полулогарифмической бумаги или оптимизации с помощью варьирования параметров b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5 5-параметрического уравнения:

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 \cdot K_i + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3)} \tag{2}$$

которое связано с уравнением:

$$\overline{M_w} = \frac{\sum_{i=1}^p y_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^p y_i} \tag{3}$$

Рекомендуется использование итерационной процедуры Гаусса-Ньютона или других методов оптимизации нелинейных регрессий. Компьютерная оптимизация более точна, поскольку в расчетах могут использоваться все экспериментальные точки (а не $p \geq 60$ секций, на которые разбивается пик при ручной оптимизации).

1.3. Критерии оптимизации калибровки

Калибровка считается приемлемой, если выполняются следующие требования (критерии пригодности калибровки):

Для ручной оптимизации:

1. Для пяти стандартов декстранов, охватывающих диапазон молекулярных масс от 4 000 у.е. до 250 000 у.е., рассчитанные по уравнениям (2-3) значения M_w не должны отличаться от паспортных значений более чем на 5 %.

2. Среднее значение для всех отклонений не должно превышать ± 3 %.

Для компьютерной оптимизации:

1. Для глюкозы рассчитанное по уравнениям (2-3) значение M_w не должно отличаться от 180 у.е. более чем на 2 единицы (± 1.1 %).

2. Для пяти стандартов декстранов, охватывающих диапазон молекулярных масс от 4 000 у.е. до 250 000 у.е., рассчитанные по уравнениям (2-3) значения M_w не должны отличаться от паспортных значений более чем на 5 %.

1.4. Проверка пригодности системы

Стандарт. Используется *EP CRS декстрана 40 для проверки пригодности системы.*

Рассчитывают среднюю молекулярную массу (M_w) стандарта по уравнению (3) с ис-

пользованием найденных при калибровке коэффициентов b_1 , b_2 , b_3 , b_4 и b_5 уравнения (2). Рассчитывают также среднюю молекулярную массу 10% высокомолекулярной фракции ($M_{w\ high}$) и среднюю молекулярную массу 10% низкомолекулярной фракции ($M_{w\ low}$).

Критерии пригодности системы. Тест на пригодность считается выполненным, если:

1. $M_w = 41\ 000 - 47\ 000$ у.е.
2. $M_{w\ high} = 110\ 000 - 130\ 000$ у.е.
3. $M_{w\ low} = 6\ 000 - 8\ 500$ у.е.

1.5. Проведение анализа субстанции декстран 40

Хроматографируют испытуемый раствор. Используя рассчитанные величины b_1 , b_2 , b_3 , b_4 и b_5 и уравнения (2-3), рассчитывают величины M_w , $M_{w\ high}$ и $M_{w\ low}$.

Критерии качества субстанции:

1. $M_w = 35\ 000 - 45\ 000$ у.е.
2. $M_{w\ high} \leq 110\ 000$ у.е.
3. $M_{w\ low} \geq 7\ 000$ у.е.

2. Обсуждение подхода ЕФ

2.1. Условия хроматографирования

2.1.1. Используемые колонки

Методика ЕФ допускает использование колонок с различными сорбентами (*поперечно-сшитая агароза для хроматографии Р* или *полиэфирный гидроксилированный гель для хроматографии Р*). Предложенные типы сорбентов можно рассматривать как рекомендуемые и не охватывающие все возможные случаи, поскольку главный критерий их приемлемости — это требования к калибровке и пригодности системы. Отметим, что декстраны являются «удобными» хроматографическими объектами, и стандарты декстранов используются для определения ММР практически со всеми сорбентами, совместимыми с водными подвижными фазами. Так, ведущие фирмы-производители используют для определения ММР декстранов современные колонки, отличные от указанных в ЕФ. В частности, фирмы «Фармакосмос» (Дания) [11] и «Биотика АО» (Словакия) [4-5] используют стирол-дивинилбензолные колонки TSK gel PW. ЕФ для разделения глобулярных протеинов с интервалом масс от 10 000 до 500 000 в иммуноглобулинах использует обычный гидрофильный силикагель [12]. Нет никаких противопоказаний и для использования, например, диольных колонок. Естественно, изменение колонки требует проведения валидации методики.

Число колонок также варьируется: фирма «Биотика АО» (Словакия) использует 2 соединенные колонки с предколонкой [2, 4], а фирма «Фармакосмос» (Дания) — 5 [11].

2.2.2. Подвижная фаза

В методике ЕФ в качестве подвижной фазы (ПФ) используется солевой раствор (натрия сульфата) с антимикробным консервантом хлорбутанолом. Методика ЕФ применяется только для контроля ММР в субстанции декстран 40, которую при анализе растворяют в подвижной фазе. Однако основным конечным продуктом является препарат «Реополиглюкин» - 10 % раствор декстрана 40 в 0.9 % водном растворе натрия хлорида, в котором (в силу важности показателя) также контролируется ММР. Поэтому для осуществления сквозного контроля (ММР в декстране и препарате «Реополиглюкин», естественно, одинаковое) предпочтительнее использовать единую методику определения ММР в декстране 40 и препарате «Реополиглюкин». Поскольку для детектирования используется рефрактометрический детектор, применение ПФ с натрия сульфатом для препарата «Реополиглюкин», содержащего натрия хлорид, может вызвать системные эффекты. Учитывая, что и колонки могут быть разными (см. выше), естественна корректура состава ПФ.

Тезис авторов [4] об опасности коррозии деталей хроматографа при применении ПФ с хлорид-ионами основывается на устаревших данных двадцатилетней давности. Капилляры и колонки из специальных марок нержавеющей стали, применяемые в современных хроматографах при использовании соответствующих приемов работы (постоянное движение ПФ через систему, промывка водой или другими растворами после окончания исследований), сегодня дают возможность использовать ПФ, содержащие натрия хлорид, для рутинных анализов методом ВЭЖХ, например препаратов иммуноглобулинов в Европейской Фармакопее [12] и гармонизованной с ней Британской Фармакопее.

Что же касается скорости ПФ и объема вводимой пробы, то данные характеристики должны обязательно оптимизироваться для каждой хроматографической системы.

2.1.3. Погрешность калибровки (градуировки): влияние температуры

Данная погрешность связана с тем, что калибровка (градуировка) проводится в один

день, а собственно анализ — в другой день (на это указывает, в частности, проверка пригодности системы). В пределах одной серии анализов (например, выполнения калибровки или собственно анализа), при соблюдении условий анализа (прежде всего, температуры), скорость ПФ остается постоянной (по крайней мере, ЕФ ничего не говорит о ее корректировке). Однако в разные дни (а калибровка и собственно анализ и проводится в разные дни) величины удерживания могут различаться, что является существенной проблемой для воспроизводимости результатов определения ММР. Одним из критических факторов является различие в температуре помещения для различных дней, что приводит к различию в объемной скорости ПФ.

Отметим, что анализ проводится на высокой чувствительности рефрактометрического детектора, и изменение температуры во время анализа приводит к очень сильному дрейфу базовой линии, что делает такие хроматограммы непригодными для обсчета. Поэтому ЕФ требует поддержания температуры системы в пределах ± 0.1 °С, что вполне доступно для термостата колонок современных хроматографов. Об установлении равновесия нагрева ПФ в системе термостатирования хроматографа можно судить по отсутствию дрейфа базовой линии, что может использоваться как один из критериев теста на пригодность хроматографической системы.

Поскольку изменение температуры сильно сказывается на результатах, возникает

вопрос, какая воспроизводимость должна быть для температуры помещения в разные дни (поскольку ПФ не термостатируется и имеет температуру помещения). Согласно общей статье ГФУ 1.2 «Общие положения», температура аналитических операций (т.е. помещений) должна быть (15 – 25) °С. В общей статье ГФУ 2.2.29. «Жидкостная хроматография» (гармонизованной с ЕФ) ничего не говорится о каких-то дополнительных требованиях к хроматографическим помещениям.

Для оценки влияния изменения комнатной температуры на результаты анализа ММР используем табличные данные по объемному расширению жидкостей (Табл. 1).

Как видно, для фармакопейного интервала температур (15-25) °С предельное изменение объема водных растворов в разные дни незначительно (0.19 % или в 1.0019 раз) и не идет ни в какое сравнение с неводными средами (именно поэтому ГФУ 4.2. «Реактивы и титрованные растворы для объемного анализа» требует внесения температурной поправки для 0.1 М раствора хлорной кислоты в уксусной кислоте). Учитывая, что реальные колебания температуры хроматографических помещений обычно не превышают 5 %, предельное изменение объема водных растворов не превышает 0.1 %, т.е. примерно соответствует точности поддержания скорости потока современных хроматографов [4].

Объемное расширение подвижной фазы за счет изменения температуры помещения равносильно умножению объема (или вре-

Таблица 1

Объемное температурное расширение жидкостей [13]

$$V_t = V_o \cdot (1 + a \cdot t + b \cdot t^2 + c \cdot t^3) \quad (t - \text{температура, } ^\circ\text{C})$$

$$\alpha_t = \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} - \text{коэффициент объемного расширения в интервале } \Delta t^\circ\text{C}$$

Вещество	$\alpha_t' \cdot 10^3$	Изменение объема для интервала (15-25) °С, %	Δt °С	$a \cdot 10^3$	$b \cdot 10^6$	$c \cdot 10^8$
вода	0.207	0.19	0 – 33	-0.064	8.505	-6.790
метанол	1.259	1.24	(-38)-(+70)	1.186	1.565	0.911
этанол	-	0.82	0 – 39	0.745	1.850	0.730
п-пропанол	0.956	0.94	0 – 94	0.774	4.969	-1.407
бензол	1.237	1.22	11 - 81	1.176	1.278	0.807
кислота муравьиная	1.025	1.01	5 - 104	0.993	0.625	0.597
кислота уксусная	1.071	1.05	16 – 107	1.063	-0.126	1.088
ацетон	1.487	1.42	0 – 54	1.324	3.809	-1.880
метилэтилкетон	1.315	1.29	0 – 76	1.187	3.370	-0.534
ацетонитрил	1.301	1.28	6 – 66	1.212	1.778	1.532
хлороформ	1.273	1.25	0 – 63	1.107	4.665	-1.743

мен) удерживания всех хроматографируемых веществ на один и тот же коэффициент. Поэтому, если параллельно испытываемому декстрану хроматографируют маркер нулевого объема (V_0) и глюкозу (V_i), то из уравнения (1) видно, что коэффициенты распределения K_i остаются неизменными, т.е. не зависят от объемного расширения ПФ за счет изменения температуры помещения (предполагается, что в рамках одной серии анализов эта температура остается постоянной). Именно поэтому ЕФ, предъявляя жесткие требования к поддержанию температуры системы (± 0.1 °C), не предъявляет дополнительных (по сравнению с обычными фармакопейными – (15 – 25) °C) требований к температуре помещения.

Однако в некоторых случаях (см. ниже) для расчетов используются не коэффициенты распределения K_i , а сами объемы V_i (или времена) удерживания. При этом привязка V_i к реальным величинам V_0 и V_i (через K_i) не проводится. Оценим влияние предельного температурного расширения водной подвижной фазы на определение ММР.

Для этого используем экспериментальные величины V_0 и V_i и рассчитанные коэффициенты b_i (Табл. 4, Диол 1, $v=3$), подставляя их в уравнение (2). Расчеты проводим для исходных V_i и V_i , умноженных на максимальный температурный коэффициент расширения водной подвижной фазы для перепада температур в 10 °C (1.0019). Результаты расчетов представлены в Табл. 2.

Как видно, искажение за счет изменения температуры помещения имеет минимум при

40 000 – 50 000 у.е. (2.02-2.13 %, что согласуется с предположительными оценками других авторов [4]), увеличиваясь при малых и при больших массах. С этой точки зрения нежелательно выходить за пределы фармакопейного диапазона молекулярных масс стандартов (4 000 – 250 000 у.е.).

Отметим, что полученные величины примерно соответствуют критическим значениям незначимости полной неопределенности анализа – см. ниже соотношение (12) [14].

Проведенные оценки показывают опасность использования объемов (или времен) удерживания вместо коэффициентов распределения K_i (1) в калибровочных уравнениях типа (2).

2.2. Калибровка

Данный вопрос является наиболее сложным в методике ЕФ и именно он определяет подход ЕФ.

Калибровка графическим методом чрезвычайно трудоемка. «Ручная» экстраполяция «S»-образной кривой вносит субъективный фактор и опасность принятия субъективного решения о качестве. Погрешности такой экстраполяции трудно оценить. Требования к пригодности калибровки достаточно жесткие, и вызывает сомнение сама возможность их выполнения при калибровке графическим методом. В то же время именно правильность калибровки в основном и определяет правильность результатов анализа.

Калибровка с использованием программного обеспечения. Используемая ЕФ калиб-

Таблица 2

Влияние изменения комнатной температуры от 15 °C до 25 °C на определение молекулярной массы (М) декстранов различной молекулярной массы

$V_0 = 10.00$ мл; $V_i = -19.02$ мл; $b_1 = -27.6114$, $b_2 = 37.68388$, $b_3 = -22.08295$, $b_4 = 17.45255$, $b_5 = -52.4223$

V	$K(V)$	$K(V \cdot 1.0019)$	$M(V)$	$M(V \cdot 1.0019)$	Искажение, %
18.164	0.905	0.909	1000	946	5.39
16.868	0.761	0.765	5000	4847	3.07
16.499	0.720	0.724	7000	6815	2.64
15.815	0.645	0.648	12000	11743	2.14
14.762	0.528	0.531	25000	24525	1.90
14.120	0.457	0.460	40000	39192	2.02
13.843	0.426	0.429	50000	48937	2.13
13.323	0.368	0.371	80000	78080	2.40
13.015	0.334	0.337	110000	107135	2.61
12.743	0.304	0.307	150000	145788	2.81
12.292	0.254	0.257	270000	261396	3.19
12.011	0.223	0.226	410000	395876	3.44
11.714	0.190	0.192	670000	644982	3.73

ровочная кривая (2) была довольно произвольно впервые предложена еще в 1974 году [15]. Она достаточно сложна (причины этой сложности не совсем понятны, поскольку любую кривую можно описать полиномом) и требует для оптимизации применения нелинейных итерационных процедур, которые осложняются еще и тем, что критериев оптимизации не один, а два (см. выше). Это не позволяет прямо применить, например, обычно используемый метод наименьших квадратов (пусть даже и в нелинейном варианте). Поэтому некоторые фирмы [2, 4, 5] используют упрощенные зависимости. Так, предполагая в (2)

$$b_5 \ll e^{(b_4 + b_1 \cdot K_i + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3)} \quad (4)$$

и проводя логарифмирование, получим 4-параметрическое уравнение:

$$\log M_i = b_4 + b_1 \cdot K_i + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3. \quad (5)$$

Из уравнения (1) видно, что использование коэффициентов распределения K_i преследует две цели:

1) приведение объемов (или времен) удерживания к единому масштабу – нормирование их на единицу (что является особенно актуальным при ручной оптимизации);

2) компенсация неизбежных колебаний величин удерживания между различными сериями опытов на одной и той же колонке (например, за счет температурных факторов – см. п. 2.1.3).

В том случае, когда имеется очень хорошая воспроизводимость величин удерживания в разных сериях опытов и в разные дни, при компьютерной оптимизации вместо коэффициентов распределения K_i можно использовать просто сами величины удерживания (например, времена удерживания t_i). Можно показать, что уравнение (5) приобретает при этом вид:

$$\log M_i = b_4 + b_1 \cdot t_i + b_2 \cdot t_i^2 + b_3 \cdot t_i^3. \quad (6)$$

Именно такое уравнение используют некоторые фирмы вместо принятого в ЕФ уравнения (2) [2, 4, 5]. Функции (5-6) значительно проще поддаются оптимизации (в правой части полином, для которого вполне применим линейный взвешенный метод наименьших квадратов), да и число параметров (b_i) здесь не пять, а четыре. Однако справедливость неравенства (4) вызывает сомнения, особенно для малых молекулярных масс и малых M_i .

Что же касается правомерности использования времен удерживания t_i вместо коэффици-

циентов распределения K_i , то это, как показано выше (см. п. 2.1.3), может привести к существенным погрешностям. Использование уравнения (6) возможно для какого-то конкретного хроматографа в хорошо кондиционированной комнате в течение достаточно узкого промежутка времени, поскольку в процессе старения колонки происходит также и изменение величин t_i даже при соблюдении всех условий анализа. Рекомендовать же такой подход (уравнение (6)) для внесения в АНД вряд ли возможно.

Кроме того, применение 4-параметрических уравнений (5-6) вместо 5-параметрического уравнения (2) ЕФ неизбежно ухудшает калибровку. Насколько это ухудшение допустимо, оценить достаточно трудно. Сами калибровочные стандарты могут вполне удовлетворять критериям пригодности калибровки по отклонению от кривой (6) (тем более, что критерии эти для декстранов достаточно либеральны). Однако это еще не означает, что для декстрана, имеющего среднюю молекулярную массу между стандартами, кривая (6) даст результат, согласующийся с уравнением (2) ЕФ. Поэтому применение соотношений (5-6) вместо (2) требует серьезного экспериментального подтверждения сопоставимости полученных результатов с ЕФ.

3.3. Калибровочные стандарты и их количество

Уравнения (2-3) можно представить в виде:

$$\overline{M}_w(j) = F(K_{ij}, b_k), \quad (7)$$

где:

F – некая функция (вид которой в данном случае не важен), индекс j указывает на стандарт, i – на сектор хроматограммы, k – на номер параметра.

Экспериментальные коэффициенты K_{ij} выступают как численные коэффициенты уравнений (7). Неизвестными же величинами являются параметры b_k , которые надо найти, минимизируя (см. п. 1.2) отклонения рассчитанных величин средних молекулярных масс стандартов $\overline{M}_w(j)$ от их паспортных значений. Таким образом, мы имеем систему 6 уравнений (5 стандартов декстранов + глюкоза) с 5 неизвестными (величины b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5).

Так как система уравнений (7) (и, соответственно, (2-3)) является 5-параметрической, то число ее степеней свободы при оптимиза-

ции равно $v = 6 - 5 = 1$. Учитывая, что двухсторонний коэффициент Стьюдента для 95 % вероятности и $v = 1$ равен 12.7 [16], говорить о какой-либо статистической надежности калибровки ЕФ не приходится. Поэтому ведущие фирмы-производители для повышения надежности калибровки стараются увеличить число калибровочных стандартов. Так, вместо 5 стандартов у ЕФ, фирма «Фармакосмос» (Дания) использует 10 [11], а фирма «Биотика» - 8 (без 670 000 и 150 000) стандартов декстранов со средними молекулярными массами 670 000 у.е., 410 000 у.е., 270 000 у.е., 150 000 у.е., 80 000 у.е., 50 000 у.е., 25 000 у.е., 12 000 у.е., 5 000 у.е., 1 000 у.е. [2, 4, 5].

Следует отметить, что уравнение (2) ЕФ предлагает для диапазона молекулярных масс от 4 000 у.е. до 250 000 у.е. Использование его для более широких диапазонов (например, 1 000 - 670 000 у.е.) требует специального обоснования. Одной из причин этого является то, что *EP CRS декстран* V_o , используемый в качестве маркера нулевого объема, имеет конечную среднюю молекулярную массу. В ЕФ эта масса не указывается, но она достаточна для указанного в ЕФ диапазона (от 4 000 у.е. до 250 000 у.е.). Расширение диапазона в сторону более высоких масс декстранов уменьшает точность анализа. Поэтому целесообразно увеличивать число стандартов в диапазоне, близком к «европейскому», например: 270 000 у.е., 150 000 у.е., 80 000 у.е., 50 000 у.е., 25 000 у.е., 12 000 у.е., 5 000 у.е.

3.4. Критерии оптимизации калибровки

Как видно из п. 1.3, ЕФ использует разный набор критериев для ручной и компьютерной оптимизации, что связано со спецификой ручной оптимизации, при которой трудно оптимизировать молекулярную массу для глюкозы в столь узких пределах (178-182 у.е.). Поэтому результаты ручной и компьютерной оптимизации, вообще говоря, приводят к разным калибровочным кривым. ЕФ считает, что такие различия допустимы.

Кроме того, в обоих случаях при оптимизации применяется набор из двух разных критериев (ручная калибровка: отклонение по каждому из стандартов декстранов $\leq 5\%$ и среднее отклонение $\leq \pm 3\%$; компьютерная калибровка: отклонение по каждому из стандартов декстранов $\leq 5\%$ и отклонение по глюкозе не более 2 у.е.).

Такой сложный набор критериев затрудняет оптимизацию калибровки и делает ее

неоднозначной, поэтому предпринимаются попытки ее упростить.

Так, некоторые фирмы вначале находят по уравнению (6) коэффициенты b_i , используя паспортные ориентировочные значения молекулярных масс стандартов в максимумах пиков (M_p), а затем варьирует их, добиваясь соответствия рассчитанных средней молекулярной (M_w) и средней числовой молекулярной масс (M_n) стандарта декстрана 50 с паспортными значениями на уровне не более 0.5 % [2, 4]. Поскольку при этом для других стандартов никаких требований к соответствию рассчитанных молекулярных масс паспортным значениям не предъявляется, то данный подход не соответствует ЕФ. Кроме того, говорить о количестве степеней свободы при такой оптимизации калибровочной кривой (даже 4-параметрической) в этом случае вообще нельзя (оно отрицательно: $v = 1 - 4 = -3$). Соответственно, трудно судить о какой-либо статистической достоверности получаемых результатов и однозначности проведенной оптимизации. Данный подход может быть вполне оправданным и давать хорошие результаты при жестко регламентированном внутривзаводском контроле, но корректность его использования в других лабораториях (работающих только по требованиям ЕФ) вызывает большие сомнения, особенно учитывая использование уравнения (6) вместо (2) и допустимые колебания температуры хроматографического помещения (см. п. 2.1.3).

Неясным в ЕФ является и выражение «среднее значение всех отклонений не должно превышать $\pm 3\%$ ». Имеется в виду алгебраическое среднее или среднее значение модулей отклонений? Судя по знаку ($\pm 3\%$), имеется в виду именно алгебраическое среднее, но по смыслу правильнее брать среднее значение модулей отклонений, поскольку в первом случае возможно систематическое смещение в одном направлении всех точек относительно калибровочной прямой.

Неоднозначным является также вопрос оптимизации для глюкозы. Из уравнения (1) видно, что для нее исходный («неоптимизированный») коэффициент распределения K обращается в единицу. Поэтому рассчитывать для нее M_w можно двумя способами:

1) разбивать пик глюкозы на $p \geq 60$ частей и затем рассчитывать как для декстранов по уравнениям (1-3); в этом случае «оптимизиро-

ванный» коэффициент распределения для глюкозы может быть и не равен единице;

2) полагать по определению, что коэффициент распределения для глюкозы равен единице; в этом случае:

$$M_w = M_i (K_i = 1) = b_3 + e^{(b_1 + b_2 + b_3 + b_4)} \quad (8)$$

Учитывая нелинейную зависимость молекулярной массы от объема удерживания, эти два подхода могут приводить к разным величинам b_i и, соответственно, к несколько разным величинам M_w . Второй подход, основанный на уравнении (8), является более естественным и, судя по рисунку в монографии [8], ЕФ так и поступает. Однако в тексте об этом прямо не сказано, что приводит к неоднозначному его толкованию.

Наличие двух критериев оптимизации калибровки в ЕФ приводит к неоднозначности получаемых значений коэффициентов b_i уравнения (2) ЕФ. Действительно, в большинстве случаев (а может и всегда) невозможно добиться одновременного минимального отклонения по обоим критериям для всех калибровочных стандартов. Критерии могут выполняться, однако это не означает, что отклонения являются минимальными и их нельзя сделать еще меньше.

Кроме того, ЕФ не требует (возможно, из-за сложности вида функции), чтобы кривая (2) была обчислена каким-то оптимальным образом. Она требует лишь выполнения критериев оптимизации. Поэтому, используя одни и те же экспериментальные данные и различные итерационные процедуры, можно получать, вообще говоря, разные значения коэффициентов b_i уравнения (2) ЕФ. Поэтому получается, что обсчет одних и тех же экспериментальных данных по уравнениям, полученным в разных лабораториях (которые используют разные итерационные процедуры) может приводить к разным результатам [5]. Что же касается результатов ручной и компьютерной оптимизации калибровки, то они, как уже говорилось выше, приводят, вообще говоря, к разным калибровочным кривым.

Нахождение коэффициентов b_i уравнения (2) относится к некорректным (ill-posed) статистическим задачам. Для ее решения в нашем случае предлагаются различные частные подходы [5]. Отметим возможность применение общего для данных задач метода самосогласованного перебора, который хорошо зарекомендовал себя при статистической обработке линейной комбинации экспонент [17].

Решение данного вопроса, однако, является уже предметом не стандартизации, а математики.

2.5. Пригодность системы

Критерии пригодности системы ЕФ также вызывают сомнения. Так, для *дексрана 40 для проверки пригодности системы* (ДППС) должно выполняться $M_w = 41\,000 - 47\,000$ у.е., $M_{w\,high} = 110\,000 - 130\,000$ у.е. и $M_{w\,low} = 6\,000 - 8\,500$ у.е. Как видно, допускается очень большой разбег значений: $\pm 6.82\%$ или ± 3000 у.е. для M_w ; $\pm 8.33\%$ или $\pm 10\,000$ у.е. для $M_{w\,high}$; $\pm 17.24\%$ или ± 1250 у.е. для $M_{w\,low}$. Отметим, что данные допуски существенно превышают требования к отклонению калибровочной кривой от приписных значений калибровочных стандартов (не более $\pm 5\%$). В то же время допуски для M_w ($\pm 6.82\%$) в ДППС уже, чем допуски для M_w в субстанции декстрана ($35\,000 - 45\,000$ или $40\,000 \pm 10\%$).

2.5.1. Требования к неопределенности характеристик ДППС и их влияние на принятие решений о качестве декстрана

В свете сказанного, возникает вопрос о том, какие же требования должны предъявляться к ДППС. В частности, какие требования предъявляет к ДППС сама ЕФ? Поскольку ЕФ об этом не пишет, то некоторые авторы [6] произвольно предполагают, что точность определения молекулярных масс ДППС (M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$) выше, чем 0.5% . Для обоснования этого авторы опять же произвольно предполагают, что при аттестации ДППС ЕФ использует «такие сложные и точные методы, как эксклюзионная хроматография с детектированием по низкоугловому рассеиванию лазерного излучения с вискозиметрическим детектором» и т.д. [6]. Следует, однако, отметить, что M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$ - величины достаточно условные, зависящие как от способа детектирования, так и, в особенности, от способа расчета. Поэтому для аттестации ДППС могут применяться только те условия и тот метод детектирования и расчета, которые описаны в ЕФ для анализа субстанции декстрана [8]. В противном случае приписываемые ДППС значения M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$ могут быть несопоставимы с аналогичными значениями для субстанции декстрана.

Какая же реальная точность приписываемых ЕФ величин M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$ для ДППС? Такую оценку можно привести из сравнения требований к калибровке с требованиями к ДППС.

ДППС является обычной субстанцией декстрана, для которой путем анализа по ЕФ получены величины M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$ (судя по допускам, это 44 000, 120 000 и 7 250, соответственно). При проверке пригодности системы необходимо убедиться, что определяемые для ДППС значения значимо не отличаются от этих величин, т.е. находятся в пределах допусков $44\,000 \pm 3\,000$ (6.82 %), $120\,000 \pm 10\,000$ (8.33 %) и $7\,250 \pm 1\,250$ (17.24 %), соответственно.

Столь широкие допуски незначимости результатов связаны с тем, что при определении ММР декстранов не используется метод стандарта (его невозможно применить). Определение ММР ДППС проводится в другой день по сравнению с калибровкой. Поэтому неопределенность для ДППС включает в себя неопределенность калибровки пользователя ДППС ($\Delta_{cal} \leq 5.0$ % для всех калибровочных стандартов), неопределенность аттестации самого ДППС (Δ_{Att}) и неопределенность сходимости результатов при собственно анализе. Как будет показано ниже, последняя величина незначима по сравнению с неопределенностью калибровки и поэтому может не учитываться в дальнейших расчетах. Результирующая неопределенность (Δ) не должна превышать указанных выше для ДППС величин. Поэтому, используя правило сложения доверительных интервалов [16], можно получить граничные оценки Δ_{Att} для разных регламентируемых молекулярных масс ДППС:

$$\begin{aligned} M_w(41000 - 47000): \\ \Delta_{Att} &= \sqrt{6.82^2 - 5.0^2} = 4.6 \%, \\ M_{w\,high}(110000 - 130000): \\ \Delta_{Att} &= \sqrt{8.33^2 - 5.0^2} = 6.7 \%, \\ M_{w\,low}(6000 - 8500): \\ \Delta_{Att} &= \sqrt{17.24^2 - 5.0^2} = 16.5 \%. \end{aligned} \quad (9)$$

Как видно, граничные оценки допустимой неопределенности аттестации ДППС очень далеки от предполагаемых авторами [6] 0.5 %. В наиболее важном случае — для M_w — эта неопределенность (4.6 %), фактически, совпадает с неопределенностью калибровки (5.0 %). Реально ЕФ получает более точные, чем (9), оценки для приписываемых ДППС значений M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$. Однако, как видно из (9), ЕФ *допускает* такие требования к ДППС. Отметим также, что неопределенность вели-

чины M_w для ДППС (6.8 %) практически совпадает с максимально допустимым незначимым различием результатов определения M_w в субстанции декстрана в разных лабораториях (7.1 % - см. п. 2.7.1), что подтверждает высказанные соображения о точности аттестации ДППС.

Столь либеральные требования ЕФ к ДППС связаны, прежде всего, с принципиально неустранимой неопределенностью калибровки и, в частности, способа оптимизации кривой, которая является неоднозначной и при которой глобальный экстремум не находится (см. п. 2.4). Поэтому даже обширный межлабораторный эксперимент (который предполагают авторы [6]) не приведет к получению генеральных значений M_w , $M_{w\,high}$ и $M_{w\,low}$ (их просто не существует в виду отсутствия глобального экстремума) и, соответственно, к повышению точности аттестации. Хотя надежность результатов (особенно при разных способах оптимизации калибровки), безусловно, возрастает. Поэтому присвоение приписных значений ДППС ГФУ проводится на основе межлабораторного эксперимента, что позволяет получить более объективную информацию о его ММР. Еще раз отметим, однако, что подобное повышение точности нивелируется различными способами оптимизации калибровочной кривой, которые не регламентируются ЕФ.

Как видно из вышесказанного, вопреки мнению авторов [6], проблемы ДППС ГФУ просто не существует.

Допуски получаемых молекулярных масс ДППС фактически регламентируют допустимые различия результатов анализа, полученные в различных лабораториях (т.е. воспроизводимость результатов). Например, на одной калибровке получили $M_w = 41\,000$ у.е., а на другой $M_w = 47\,000$ у.е. Обе системы пригодны, однако результаты определения ММР субстанций декстрана на них будут разными и, соответственно, разными могут быть и выводы о качестве.

Нетрудно видеть, что допустимое расхождение в M_w для *EP CRS декстран 40 для проверки пригодности системы* может приводить к конфликтным ситуациям при принятии решений о качестве. Отметим, что данные допуски применяются для различных хроматографических систем и калибровочных кривых. Для одной и той же хроматографической системы и калибровочной кривой (т.е. для контроля пригодности в лаборатории) целесообразно использовать более же-

сткие требования к воспроизводимости результатов.

Кроме того, используемый стандарт декстрана для проверки пригодности системы выходит за пределы диапазона молекулярных масс субстанций декстран 40 (35 000 – 45 000 у.е.). Целесообразно «сдвинуть» характеристики стандарта декстрана для проверки пригодности системы в этот диапазон. По такому пути пошли при аттестации ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы [18].

2.5.2. Регламентация других характеристик ДППС

Следует также отметить, что ЕФ [8] не регламентирует столь важные для хроматографии величины [19] как эффективность пиков (число теоретических тарелок), отношение сигнал/шум, степень разделения пика декстрана с пиком глюкозы и сходимость хроматографического сигнала. А ведь эти величины оказывают большое влияние на качество хроматографии и, в соответствии с [19], должны регламентироваться.

Отношение сигнал/шум. При определении ММР приходится использовать низкие концентрации испытуемого раствора, т.к. хроматографическая система очень чувствительна к перегрузке (проявляется в изменении времен удерживания с ростом концентрации). Регламентация отношения сигнал/шум позволяет избежать искажения результатов расчетов за счет шума. При этом целесообразно исходить из минимально допустимых требований, которые необходимы при самой грубой оптимизации – ручной. В этом случае пик разбивается на $p \geq 60$ секций. Крайние секции (1-ая и 60-ая) должны иметь высоту (h_1 и h_{60}), превышающую утроенную величину шума (N) [9]:

$$h_1, h_{60} > 3 \cdot N \quad (10)$$

Степень разделения пика глюкозы с декстраном 40. Поскольку высоты пиков глюкозы и декстрана 40 сильно различаются, для характеристики их разделения нельзя использовать общепринятый коэффициент разделения [20]. Целесообразно нормировать высоту в минимуме (h_{min}) между этими двумя пиками, считая, что она не должна превышать утроенной величины шума [9]:

$$h_{min} < 3 \cdot N \quad (11)$$

Сходимость хроматографического сигнала. Каковы требования к сходимости результатов параллельных хроматограмм на стадии

проверки пригодности системы? Очевидно, что нет смысла регламентировать сходимость времен удерживания. Целесообразно регламентировать результаты расчета ММР для параллельных хроматограмм. Если число параллельных хроматограмм n , а относительное стандартное отклонение рассчитанной молекулярной массы для декстрана 40 для проверки пригодности системы равно $RSD\%$, то доверительный интервал неопределенности этих молекулярных масс должен быть незначим по сравнению с разрешенными для них допусками. Учитывая соотношение (9), а также принцип незначимости [14], получим:

M_w :

$$\Delta(M_w) = \frac{t(95\%, n-1) \cdot RSD(M_w)}{\sqrt{n}} \leq \leq 6.82 \cdot 0.32 = 2.18\%,$$

$M_{w\ high}$:

$$\Delta(M_{w\ high}) = \frac{t(95\%, n-1) \cdot RSD(M_{w\ high})}{\sqrt{n}} \leq \leq 8.33 \cdot 0.32 = 2.66\%, \quad (12)$$

$M_{w\ low}$:

$$\Delta(M_{w\ low}) = \frac{t(95\%, n-1) \cdot RSD(M_{w\ low})}{\sqrt{n}} \leq \leq 17.24 \cdot 0.32 = 5.50\%.$$

Отсюда получим требования к относительному стандартному отклонению (RSD) рассчитанных значений M_w , $M_{w\ high}$ и $M_{w\ low}$ на стадии проверки пригодности системы в зависимости от числа (n) параллельных хроматограмм [14] (Табл. 3).

При проведении собственно анализа субстанции декстрана следует делать количество параллельных хроматограмм не меньше, чем на стадии проверки пригодности системы [21].

Отметим, что соотношение (12) можно использовать и как критические значения неопределенностей на стадии аттестации ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы. Эти требования значительно жестче требований (9) ЕФ. Однако, как уже было сказано выше, они не могут учесть неопределенность градуировки и, самое главное, расчета калибровочной кривой каждым пользователем.

Таблица 3

Требования к относительному стандартному отклонению (*RSD*) рассчитанных значений M_w , M_w^{high} и M_w^{low} декстрана 40 для проверки пригодности системы на стадии проверки пригодности системы

<i>n</i>	2	3	4	5	6	1/15*
<i>RSD</i> (M_w)%	0.35	1.06	1.60	2.05	2.42	1.24
<i>RSD</i> (M_w^{high})%	0.42	1.29	1.96	2.50	2.95	1.51
<i>RSD</i> (M_w^{low})%	0.87	2.66	4.05	5.16	6.10	3.12

* проводится одно измерение, но *RSD* (и, соответственно, коэффициент Стьюдента) известно из 15 хроматограмм

2.6. Собственно анализ субстанции декстран 40

Из текста статьи ЕФ совершенно непонятно, откуда берутся величины V_o и V_l для расчета по уравнению (1) коэффициентов распределения при проверке пригодности системы и собственно анализе: используются ли величины, полученные при калибровке, или они получают заново при каждом анализе. В последнем случае, который представляется наиболее естественным, надо параллельно с испытуемым раствором и раствором для проверки пригодности системы вводить и растворы маркеров: *EP CRS* декстран V_o и глюкозу, что и делают некоторые фирмы (например, «Фармакосмос», Дания). Однако об этом в ЕФ ничего не говорится, что вызывает ее неоднозначное толкование.

2.7. Точность методики ЕФ (принятие решений о качестве)

2.7.1. Воспроизводимость

Каковы же требования к воспроизводимости результатов определения ММР по ЕФ? Без ответа на этот вопрос невозможно провести валидацию методик (собственно, по этой причине она и не проводилась). Ведь согласно ГФУ [9], «валидация аналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения поставленных задач», т.е. для проведения анализа с заданной точностью. А какова должна быть эта «заданная точность» — на это ЕФ ответа не дает. Соответственно, невозможно сделать заключение о допустимых различиях определения ММР в разных лабораториях в том случае, когда, например, одна лаборатория забраковала субстанцию декстрана 40 по ММР, а вторая дала положительный результат.

Ответ на данный вопрос можно получить из требований к калибровке. Рассчитанные значения M_w стандартов не должны отличаться от их паспортных значений более чем на 5%. Соответственно, рассчитанное значение

M_w для анализируемого образца субстанции декстрана или реополиглобулина может отличаться от его истинного значения на 5%, и это отклонение ЕФ не считает статистически значимым. Статистически же незначимое различие результатов определения M_w в двух разных лабораториях, работающих строго по требованиям ЕФ, может достигать $\sqrt{2} \cdot 5 = 7.1\%$ [22]. При росте числа анализов статистически незначимое различие возрастает [22]. Справедливость этого подтверждает и ЕФ, которая требует, чтобы значения M_w для *EP CRS* декстрана 40 для проверки пригодности системы находились в интервале 41 000 — 47 000, т.е. $44\,000 \pm 3\,000$, т.е. $\pm 6.8\%$, что близко к 7.1%. Для уменьшения этих различий точность анализа на заводе-производителе должна быть гораздо выше, чем требования АНД [22].

В соответствии подходом ЕФ [23], к допускам в спецификации не должны применяться какие либо дополнительные доверительные интервалы (т.е. полученные результаты должны приниматься «как есть»). Это означает, что если истинное значение находится вблизи границы допуска (например, $M_w = 35\,400$ при норме 35 000 — 45 000), то это может приводить к противоположным заключениям о качестве в двух разных лабораториях, причем каждый полученный результат является корректным.

Поэтому, например, результаты, полученные при анализе субстанции декстран 40 и изготовленных из нее четырех серий препарата «Реополиглобулин» в двух разных лабораториях [2], являются с точки зрения ЕФ статистически равноценными. Действительно, максимально различие между результатами определения ММР двух лабораторий по каждой серии составляет 2350 (32300 у.е. и 34650 у.е.), что составляет 7.0% к среднему, что не превышает критического значения 7.1%. Отметим еще раз, что данные различия связаны с погрешностью калибровки, допускаемой ЕФ. Поэтому здесь не помогут даже

такие мощные методы контроля качества продукции, как секвенциональный анализ [16].

Во избежание конфликтных ситуаций, производитель при выпуске должен использовать более жесткие внутренние спецификации. Соответственно, производитель препарата «Реополиглюкин» не должен приобретать субстанцию с граничным значением ММР [2]. Исходя из вышесказанного, можно рекомендовать следующие «гарантирующие» допуски:

$M_w = 37\,000 - 43\,000$ у.е., желательно $M_w = 37\,800 - 42\,200$ у.е. $M_{w\,high} < 104\,800$ у.е., желательно $M_{w\,high} < 102\,700$ у.е. $M_{w\,low} > 7\,350$ у.е., желательно $M_{w\,low} > 7\,500$ у.е. (13)

2.7.2. Округление результатов

Принятие решений о качестве субстанций декстран 40 поднимает и другую проблему — округление результатов.

В соответствии с подходом ЕФ, «результат, полученный в испытании, округляют до указанного в допусках количества значащих цифр (если нет иных указаний)» [23]. Однако для ММР допуски выражаются в тысячах (35 000 — 45 000), при этом указания по округлению результатов отсутствуют. Таким образом, вопрос округления результатов имеет практическую значимость, поскольку неясно, что делать, например, с таким результатом как $M_w = 34510$ у.е. Следует ли браковать препарат или округлять результат до 35 000 (и тогда препарат соответствует требованиям ЕФ)? Данный вопрос в ЕФ прямо не решается.

В фармакопейных методиках количественного определения результаты обычно представляются с точностью до 0.1 % к номиналу (например, 95.8 % к номиналу). В нашем случае это соответствует 40 у.е. для $M_w = 40\,000$ у.е., 110 у.е. для $M_{w\,high} = 110\,000$ у.е., 7 у.е. для $M_{w\,low} = 7\,000$ у.е. Как видно, округлять надо до 10 у.е., и никаких спорных вопросов при этом округление вызвать не может. В вышеуказанном случае ($M_w = 34510$ у.е.) никаких дальнейших округлений делать не надо, и препарат бракуется. Что же касается пограничных значений, то производителям следует выпускать и покупать субстанцию декстран 40 с «гарантирующими» допусками (13).

3. Экспериментальная часть

Учитывая выше развитые положения, нами была разработана методика определе-

ния ММР в субстанции декстран 40 и готовом лекарственном средстве «Реополиглюкин», которая была применена к различным сорбентам, колонкам, числу колонок и калибровочным кривым. Основной задачей было проверить воспроизводимость методики в этих условиях. В качестве объекта исследования нами был выбран ФСО декстрана для проверки пригодности системы. Полученные результаты использованы для получения приписных значений его ММР.

3.1. Условия анализа

Жидкостный хроматограф «Waters 2690 Alliance» № WAT0270800 с диодноатричным детектором.

Колонки: Использовали следующие хроматографические системы:

1. Две колонки размером 0.25 м × 8.0 мм, заполненные, соответственно, сорбентами Диасорб Диол 400 и Диасорб Диол 120, с размером частиц 10 мкм; фирма «Элсико», Россия. Использовали два набора колонок: далее — «Диол 1» и «Диол 2». Эффективность их (по пику глюкозы) менялась в процессе работы от $n = 14400$ т.т. до $n = 7000$ т.т., что не сказывалось заметно на результатах. N (шум) = 0.03, h_{min} (между глюкозой и декстранами) = 0.06, т.е. соотношение (11) выполняется.

2. Две колонки размером 0.3 м × 7.5 мм TSK Gel PW 3000 и TSK Gel PW 4000 (далее — «TSK»); $n = 21000$ т.т.. N (шум) = 0.02, h_{min} (между глюкозой и декстранами) = 0.00, т.е. соотношение (11) выполняется.

3. 1 колонка Ultrahydrogel 500 размером (250 · 8) мм (далее — «Ultrahydrogel»). $n = 14000$ т.т.. N (шум) = 0.014, h_{min} (между глюкозой и декстранами) = 0.033, т.е. соотношение (11) выполняется.

Подвижная фаза. Во всех случаях использовали 0.9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0.025 % натрия азида *P*, скорость 1 мл/мин. Применение натрия хлорида в ПФ позволяет избежать системных эффектов при анализе ММР в препарате «Реополиглюкин» и, как следствие, в декстране 40. Растворы натрия хлорида коррозионно активны (именно поэтому в ЕФ и используют натрия сульфат, а не натрия хлорид), однако современные хроматографы имеют коррозионно стойкое исполнение и позволяют работать с растворами галогенидов. В частности, фирма «FLUKA Chemie AG» выпускает тетрабутиламмония хлорид в качестве ион-парного реагента. Поэтому нет принципиальных возражений против использования натрия хлори-

да вместо натрия сульфата. Хроматографические же преимущества такой замены для анализа препарата «Реополиглюкин» очевидны.

Контроль температуры. Температура колонки (30 ± 0.1) °C. Для нивелирования изменений величин удерживания между калибровкой и собственно анализом, используется принятая фирмой «Фармакосмос» (Дания) [11] корректировка времен удерживания по пику глюкозы, которая вводится вместе с маркером нулевого объема *EP CRS декстран V₀*.

Стандарты для калибровки: *декстраны для калибровки (ДК) 5, 12, 25, 50, 80, 150, 270 и глюкоза P*. По сравнению с фирмами «Фармакосмос» (Дания) [11] и «Биотика АО» (Словакия) [2] число стандартов уменьшено: исключены стандарты с молекулярными массами 670 000 у.е., 410 000 у.е. и 1 000 у.е., поскольку они находятся слишком далеко от регламентируемых значений M_w , $M_{w\ high}$ и $M_{w\ low}$. Для сравнения, в некоторых случаях дополнительно использовали также *декстраны для калибровки 1 и 410*. Паспортные значения декстранов для калибровки, соответственно, были: 1270 у.е., 5220 у.е., 11600 у.е., 23800 у.е., 48600 у.е., 80900 у.е., 147600 у.е., 273000 у.е., 409800 у.е.

Как видно, число степеней свободы при калибровке равно $\nu = (7 + 1) - 5 = 3$, что существенно больше, чем по ЕФ ($\nu = 1$). Это эквивалентно построению калибровочной прямой по 5 точкам и соответствует общей статье ГФУ по валидации, которая требует не

менее 5 точек при построении калибровочной прямой [9]. В случае использования дополнительно *декстрана для калибровки 1* число степеней свободы повышается до $\nu = 4$, а при использовании еще и *декстрана для калибровки 410* - до $\nu = 5$.

Типичные хроматограммы калибровочных стандартов декстранов и глюкозы приведены на Рис. 1.

Стандарт для проверки пригодности системы: *ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы*, в качестве которого была выбрана промышленная серия субстанции декстран 40.

Типичная хроматограмма *ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы* приведена на Рис. 2.

3.2. Расчет калибровочных коэффициентов уравнения (2)

Оптимизацию проводили для разных типов хроматографических систем и различного числа калибровочных стандартов. При расчетах использовали соотношения (2-3). Для глюкозы использовали соотношение (8).

Калибровочные данные были получены в разное время. Это позволяет моделировать проведение анализа в разных лабораториях, использующих разное число калибровочных стандартов. Результаты расчетов представлены в Табл. 4-5. Для информации в Табл. 5 приведены также средние значения модулей отклонений, хотя они не являются обязательными при компьютерной оптимизации. Типичная калибровочная кривая приведена на Рис. 3.

Рисунок 1

Типичные хроматограмма стандартов декстранов и глюкозы (хроматографическая система Диол 1)

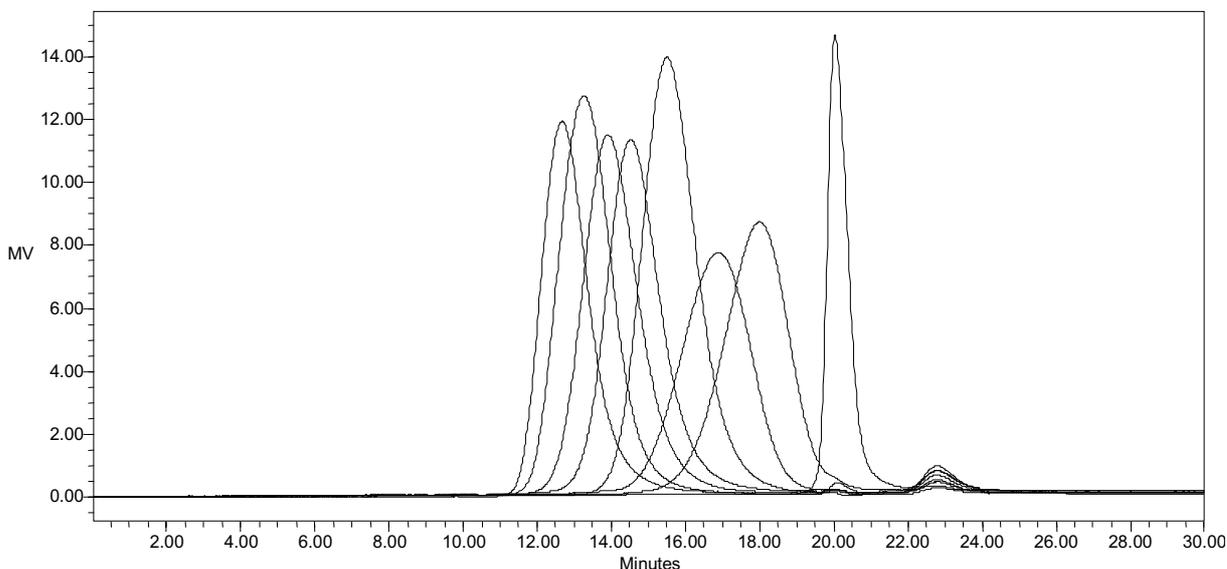
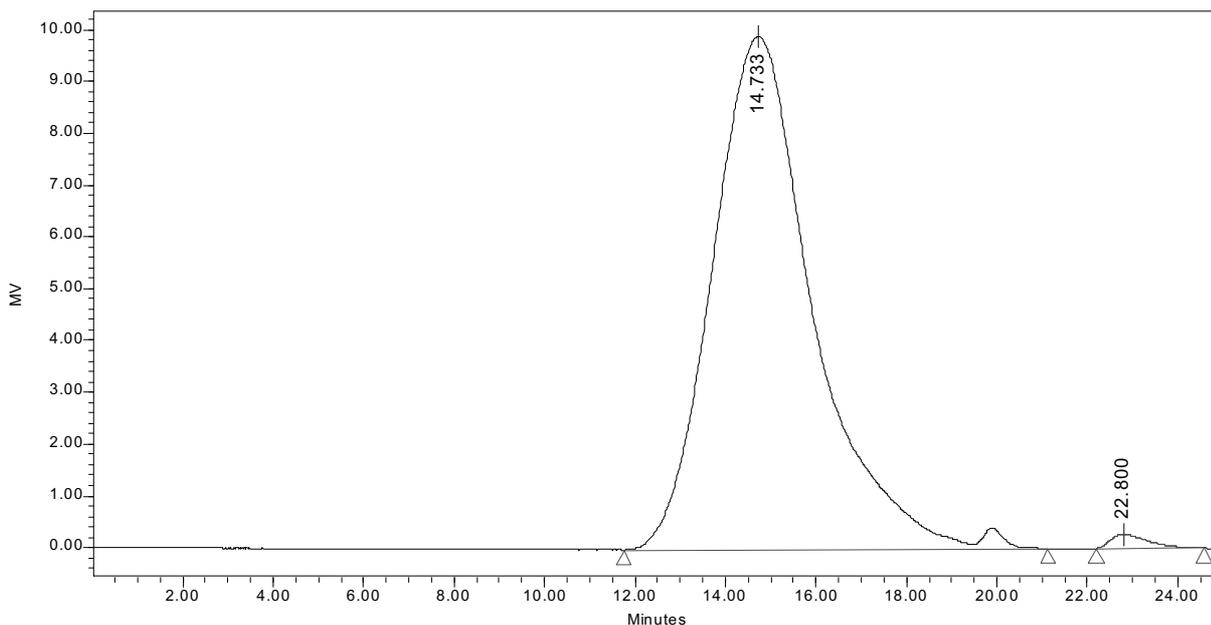


Рисунок 2



Типичная хроматограмма ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы (хроматографическая система Диол 1)

3.3. Анализ ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы

Проводили определение ММР на трех типах хроматографических систем и различных типах калибровочных кривых, указанных выше. Расчеты ММР проводили по уравнениям (1-3) для всех типов калибровочных кривых, указанных в Табл. 4. Результаты расчетов приведены в Табл. 6.

Поскольку представляла интерес воспроизводимость рассчитанных значений ММР ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы для параллельных хромато-

грамм, подобные оценки были сделаны для 15 параллельных хроматограмм на хроматографической системе Диол 1. Результаты расчетов приведены в Табл. 7. Полученное из 15 хроматограмм значение RSD должно удовлетворять требованиям Табл. 3 (1/15).

4. Обсуждение результатов

4.1. Воспроизводимость методики на разных хроматографических системах и разных калибровочных кривых

Как видно из Табл. 4, коэффициенты b_i уравнения (2) довольно сильно различаются

Таблица 4
Коэффициенты уравнения (2)
(ν - число степеней свободы)

№	Колонки, дата	ν	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5
1.	Диол 1 18.01.99	3	-27.61140	37.68388	-22.08295	17.45255	-52.42230
	+ДК 1	4	-23.5923	28.26812	-15.29053	16.93802	-375.91936
	+ДК 1	5	-24.52591	30.01755	-16.33498	17.08392	-331.65581
	+ДК 410						
2.	Диол 2 19.08.00	3	-29.1667	43.56937	-27.33375	17.45172	89.60583
	+ДК 1	4	-22.62419	27.17057	-14.78882	16.66626	-434.85438
3.	Диол 2 31.10.00	3	-26.70422	36.37893	-21.38677	17.25067	-75.82642
	+ДК 1	4	-23.53325	28.60288	-15.57226	16.85914	-394.73521
4.	Диол 2 25.08.01	3	-28.02612	39.37115	-23.60959	17.50633	-7.50333
5.	TSK 23.11.03	3	-19.28212	33.33504	-27.64801	14.74875	178.33023
6.	TSK 10.01.04	3	-20.3349	43.2984	-45.1748	14.1108	181.4997
7.	Ultrahydrogel 17.07.03	3	-24.32458	29.53391	-17.97532	18.60962	-166.52939
		4	-25.57664	31.94927	-19.45843	18.81201	-128.3039

Таблица 5

Отклонения калибровочной кривой от паспортных значений стандартов
(для глюкозы во всех случаях отклонение было ± 1.5 у.е. ($0.83\% \leq 2$ у.е.))

№	Колонки, дата	ν	Отклонения для калибровочных стандартов (= 5%)									Ср*
			1	5	12	25	50	80	150	270	410	
1.	Диол 1 18.01.99	3	-	-2.95	-1.34	-0.40	2.97	1.35	-3.00	2.99	-	2.15
	+ДК 1	4	2.98	-2.98	2.51	2.97	3.47	0.51	-3.80	3.59	-	2.85
	+ДК 1 +ДК 410	5	2.99	-3.41	2.25	2.99	3.63	0.58	-4.05	2.99	2.91	2.87
2.	Диол 2 19.08.00	3	-	2.52	-2.45	-3.20	3.49	3.18	-3.84	3.56	-	3.18
	+ДК 1	4	4.65	-4.99	1.44	2.66	4.82	1.98	-4.99	4.99	-	3.81
3.	Диол 2 31.10.00	3	-	-3.96	-1.72	-0.74	3.90	3.52	-4.76	3.99	-	3.23
	+ДК 1	4	4.48	-4.96	1.69	2.68	4.79	3.20	-4.99	4.98	-	3.97
4.	Диол 2 25.08.01	3	-	2.00	-2.13	-2.21	1.27	2.97	-3.14	2.85	-	2.37
5.	TSK 23.11.03	3	-	1.74	-0.23	2.34	1.77	2.86	-2.99	2.25	-	2.03
6.	TSK 10.01.04	3	-	2.29	-1.68	-3.15	3.32	3.10	-3.65	3.34	-	2.93
7.	Ultrahydrogel 17.07.03	3	-	-1.17	1.36	-1.33	0.08	0.99	-0.99	-0.86	-	0.97
		4	-1.17	-0.24	1.49	-1.52	0.12	1.32	-0.50	-0.99	-	0.92

* Среднее модулей

для разных колонок и разного количества стандартов (ДК), взятых для построения калибровочной кривой. Это подтверждает выводы п. 2.3 о статистической неустойчивости уравнения (2). Особенно сильно влияет добавление ДК 1. В то же время, как видно из Табл. 5, во всех случаях удается выполнить требования ЕФ к калибровочной кривой (см. п. 1.3). При этом, в соответствии с п. 2.1.1, для исследованных хроматографических систем особой роли не играет ни тип сорбента, ни количество колонок (так, абсолютно лучшие

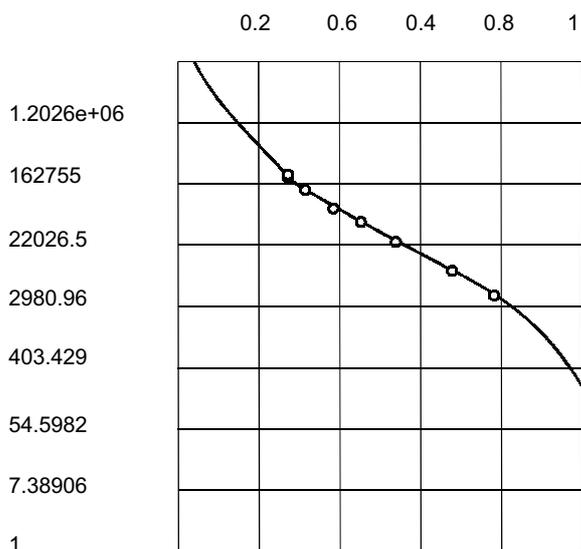
результаты были получены на одной колонке Ultrahydrogel), ни их эффективность, ни то, что была использована подвижная фаза с натрием хлоридом. Это подтверждает положения п. 2.1.1 о возможности использования разных хроматографических систем, отличных от ЕФ.

Следует отметить, что сужение области калибровки (т.е. исключение ДК 1 и ДК 410) обычно улучшает выполнение калибровочной кривой (можно показать, что уменьшаются не только средние значения модулей отклонений, но и остаточное стандартное отклонение от кривой). Это подтверждает теоретические предположения о желательности не выходить за пределы фармакопейного диапазона калибровки 4 000 – 250 000, поскольку при этом ухудшается калибровка. Таким образом, при проведении фармакопейного анализа декстрана 40 нет необходимости использовать число калибровочных стандартов декстрана более 7.

4.2. Воспроизводимость расчетов ММР ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы для разных хроматографических систем

Из Табл. 6 видно, что результаты определения ММР, несмотря на различие хроматографических систем и калибровочных уравнений, полученных в разное время, дают статистически неразличимые результаты. Это видно из сравнения результатов обработки всех данных и данных только для 7 стандар-

Рисунок 3



Типичная калибровочная кривая для колонки Диол 1 ($\nu = 3$)

Таблица 6

Результаты расчетов ММР ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы для различных хроматографических систем и калибровочных кривых

№	Колонки	Дата	ν	M_w	M_w^{high}	M_w^{low}
1.	Диол 1	18.01.99	3	38010	110450	6910
			4 (+ ДК 1)	38440	111330	6940
			5 (+ДК 1, +ДК 410)	38410	108740	7020
2.	Диол 2	19.08.00	3	38530	112960	6700
			4 (+ ДК 1)	39230	109960	6430
3.	Диол 2	31.10.00	3	38530	112960	6700
			4 (+ ДК 1)	38160	110020	6770
4.	Диол 2	25.08.01	3	39105	108940	6630
5.	TSK	23.11.03	3	39710	109370	7320
6.	TSK	10.01.04	3	38980	108510	6900
1.	Ultrahydrogel	17.07.03	3	40230	109230	6570
			4 (+ ДК 1)	39910	108450	6120
Среднее по всем				38937	110076.7	6750.83
RSD по всем, %				1.84	1.44	4.54
Доверительный интервал единичного $\Delta_I(95\%)$, по всем, %				3.31	2.59	8.15
Требования (12) к $\Delta_I(95\%)$, %				≤ 6.82	≤ 8.33	≤ 17.24
Доверительный интервал среднего $\Delta_{aver}(95\%)$, по всем, %				0.95	0.75	2.35
Требования соотношения (12) к $\Delta_{aver}(95\%)$, %				≤ 2.18	≤ 2.66	≤ 5.50
Интервал значений, по всем				38010 - 40230	108450 - 112960	6120 – 7320
Максимальное различие, по всем				2220 (5.67%)	4510 (4.07%)	1200 (17.86%)
<i>Среднее, по $\nu = 3$</i>				<i>39014</i>	<i>110345.7</i>	<i>6818.57</i>
RSD, по $\nu = 3$, %				1.94	1.70	3.75
$\Delta_I(95\%)$, по $\nu = 3$, %				3.78	3.31	7.28
Требования (12) к $\Delta_I(95\%)$, %				≤ 6.82	≤ 8.33	≤ 17.24
$\Delta_{aver}(95\%)$, по $\nu = 3$, %				1.43	1.25	2.75
Требования соотношения (12) к $\Delta_{aver}(95\%)$, %				≤ 2.18	≤ 2.66	≤ 5.50
Интервал значений, по $\nu = 3$				3.78	3.31	7.28
Максимальное различие, по $\nu = 3$				2220 (5.67%)	2510 (2.25%)	410 (5.76%)

Таблица 7

Воспроизводимость расчетов ММР для 15 параллельных хроматограмм ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы (хроматографическая система Диол 1)

Величины	RSD%	Критическое значение RSD% (Табл. 3 – 1/15)
M_w	0.20	1.24
M_w^{high}	0.55	1.51
M_w^{low}	1.55	3.12

тов декстрана ($\nu = 3$). При этом максимальное различие для M_w достигает 5.67 % и одинаково для разных калибровочных выборок. Данная величина, хотя и меньше допустимого значения 7.1 % (см. п. 2.7.1), но является достаточно большой, что подтверждает необходимость использования «гарантирующих» допусков (13) при производстве декстран 40

и готовых лекарственных средств на его основе.

Особый интерес представляют доверительные интервалы единичных значений ($\Delta_I(95\%)$), которые моделируют результаты определения ММР субстанции декстран 40 и препаратов на его основе в разных лабораториях. Величины $\Delta_I(95\%)$, хотя и более чем

вдвое меньше допусков ЕФ (соотношение (12)), но все же очень значительны (особенно для $M_{w\ low}$). Из сравнения Табл. 6-7 видно, что сходимость параллельных хроматограмм не может быть причиной таких больших расхождений, которые явно вызваны принципиально неустранимым различием калибровочных кривых.

Как видно, даже в рамках одной лаборатории, при использовании разных колонок и калибровочных кривых могут получаться достаточно сильно различающиеся результаты (особенно это касается величин $M_{w\ low}$, где максимальные различия достигают 17.86 %), которые, тем не менее, являются приемлемыми с точки зрения ЕФ.

4.3. Приписные значения ММР ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы

Поскольку нет статистически значимых различий между значениями ММР, полученными при различных числах калибровочных стандартов, в качестве приписных значений ММР ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы целесообразно взять объединенные результаты по всем хроматографическим системам и калибровочным кривым. Это позволяет, в частности, также учесть возможность использования разными лабораториями различных хроматографических систем, различного числа калибровочных стандартов и разных способов оптимизации калибровочной кривой.

С учетом требований (12) ЕФ к ММР декстрана 40 для проверки пригодности системы, получим следующие приписные значения:

$M_w = 38940 \pm 372$ (0.95 %); регламентируемый диапазон 36290 — 41590 у.е.

$M_{w\ high} = 110080 \pm 823$ (0.75 %); регламентируемый диапазон 100940 — 119210 у.е.

$M_{w\ low} = 6750 \pm 159$ (2.35 %); регламентируемый диапазон 5640 — 7860 у.е.

В качестве доверительных интервалов приписных значений ММР использованы величины Δ_{aver} (95 %) из Табл. 6. Данные величины отражают разброс значений ММР, полученный при аттестации, однако, как уже отмечалось в п. 2.5.1, они не могут учесть погрешность градуировки конкретного пользователя, что является принципиальной особенностью методики анализа ММР, описанной в ЕФ.

При расчете регламентируемого диапазона учитывали требования (12) ЕФ для каждой величины и округление до 10 ед.

Выводы

1. Проведен систематический анализ проблем, возникающих при применении жидкостно-хроматографической методики контроля молекулярно-массового распределения декстранов, описанной в Европейской Фармакопее, и даны рекомендации по ее уточнению для включения в национальную часть Дополнения 1 к Государственной Фармакопее Украины.

2. На основе полученных рекомендаций разработана методика контроля молекулярно-массового распределения субстанции декстран 40 и препаратов на его основе, которая была воспроизведена на различных типах хроматографических систем.

3. Проведен анализ и аттестация ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы.

4. Предложена методическая основа проведения валидации методики контроля молекулярно-массового распределения препаратов декстрана 40, которая апробирована на примере аттестации ФСО ГФУ декстрана 40 для проверки пригодности системы и может быть использована в других лабораториях, контролирующих качество этих препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. - 14-е издание. - Москва: «Новая волна», 2000. - Т. 2. - С. 131.
2. Варченко В.Г., Сур С.В., Пилипенко И.В. Вопросы обеспечения качества инфузионных растворов промышленного производства: обсуждение примера // Провизор. - № 24. - 2003. - С. 9-11.
3. Сур С.В., Мартюшова В.М., Нігматулін Р.Р. Визначення молекулярно-масового розподілу полівінілпіролідону у препаратах "Гемодез" і "Гемодез-Н" за допомогою ексклюзивної ВЕРХ // Фармацевтичний журнал. - 1997. - № 5. - С. 57-64.
4. Варченко В., Дидух И., Герасимчук Т., Козлов А., Левин М. Некоторые проблемы определения молекулярно-массового распределения в декстране 40 и лекарственных препаратах на его основе при помощи эксклюзионной хроматографии по АНД, действующим в Украине // Вісник фармакології і фармації. - 2003. - № 9. - С. 25-30.
5. Варченко В., Дидух И., Герасимчук Т., Козлов А., Коробов А., Левин М. Некоторые особенности определения параметров молекулярно-массового распределения декстранов по Европейской Фармакопее // Вісник фармакології і фармації. - 2003. - № 11. - С. 45-49.
6. Варченко В., Герасимчук Т., Дидух И., Левин М., Козлов А. О стандартных образцах и стандартах Государственной Фармакопее Украины в частности. Сообщение 1 // Вісник фармакології і фармації. - 2003. - № 12. - С. 40-41.
7. Dextran 40 for injection // European Pharmacopoeia, 4th ed. - Supplement 4.7. - 2003. - CD-ROM version..
8. Molecular mass distribution in dextrans // European Pharmacopoeia, 4th ed. - Supplement 4.7. - 2003. - CD-ROM version.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприєм-

- ство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
10. Порядок проведення атестації та акредитації лабораторій з контролю якості та безпеки лікарських засобів. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 10 від 14.11.2004: Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 30.01.2004, № 130/8729. – 14 с.
 11. Pharmacosmos Dextran Standards.
 12. Human normal immunoglobulin for intravenous administration // European Pharmacopoeia, 4th ed. - Supplement 4.7. - 2003. - CD-ROM version.
 13. Справочник химика. – 2-е изд. - Ленинград-Москва: ГНТИ химической литературы, 1963. – Том 1. - С. 568.
 14. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Фізiологiчно активнi речовини. – 2001. - № 1 (31). - С. 32-44.
 15. Nilsson G. Molecular-weight distribution determination of clinical dextran by gel-permeation chromatography // J. Chromatography. - 1974. – Vol. 101. - P.137-153.
 16. Проект общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистический анализ результатов химического эксперимента[№]» // Фармаком. – 2003. - № 1. – С. 19- 53.
 17. Levin M.G., Grizodub A.I., Asmolova N.N. et al. Model of Mixed Adsorption Centre for Description of Retention in Liquid Chromatography with Multicomponent Mobile Phases // Chromatographia. - 1993. -Vol.37, No. 9/10. - P. 517-524.
 18. Леонтьев Д.А. Валидация аналитических методик и испытаний. Система Фармакопейных стандартных образцов Государственной Фармакопеи Украины // Фармаком. – 2002. - № 1. - С. 36-43.
 19. Separation Techniques // European Pharmacopoeia, 4th ed. - Supplement 4.7. - 2003. - CD-ROM version.
 20. 2.2.29. Рідинна хроматографія // Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е видання. – Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 47-49.
 21. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 3. Выполнение теста «Количественное определение» при одновременном контроле качества нескольких образцов лекарственных средств хроматографическими методами // Фармаком. – 2002. - № 4. – С. 6-14.
 22. Гризодуб А.И., Архипова Н.Н., Кожушко Г.И., Зволинская Н.Н., Леонтьев Д.А. Аттестация промышленных таблеток в качестве тестовых образцов для профессионального тестирования лабораторий по контролю качества лекарственных средств: учет факторов неоднородности // Фармаком. – 2003. - № 3 – С. 5-19.
 23. 1.4. Монографії // Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е видання. – Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 5-7.

Резюме

Леонтьев Д.А., Гризодуб О.И., Підпружников Ю.В., Іванов Л.В.

Фармакопейні аспекти методики визначення молекулярно-масового розподілу в субстанції декстран 40 і готовому лікарському препараті «Реополіглюкін»

У рамках розробки Державної Фармакопеї України, проведений систематичний аналіз проблем, що виникають при застосуванні рідинно-хроматографічної методики контролю молекулярно-масового розподілу декстранів, описаної в Європейській Фармакопеї, і дані рекомендації з її уточнення для включення в національну частину статті 2.2.39. «Молекулярно-масовий розподіл

декстранів» Доповнення 1 до Державної Фармакопеї України. На основі одержаних рекомендацій розроблена методика контролю молекулярно-масового розподілу субстанції декстран 40 і препаратів на його основі, яка була відтворена на різних типах хроматографічних систем. Проведений аналіз і атестація *ФСЗ ДФУ декстрану 40 для перевірки придатності системи*. Запропонована методична основа проведення валідації методики контролю молекулярно-масового розподілу препаратів декстрану 40, яка апробована на прикладі атестації *ФСЗ ДФУ декстрану 40 для перевірки придатності системи* і може бути використана в інших лабораторіях, які контролюють якість цих препаратів.

Summary

Leontiev D.A, Gryzodub. O.I., Podpruzhnikov Yu.V., Ivanov L.V.

Pharmacopoeial aspects of the molecular-mass distribution determination procedure in «Dextran 40» substance and medicinal preparation «Rheopolyglucin»

Within the framework of development of the Ukrainian State Pharmacopoeia, a systematic analysis of problems arising from application of the European Pharmacopoeia HPLC method of dextran molecular mass distribution control is conducted and recommendations on its clarification for the inclusion in the national part of the Ukrainian State Pharmacopoeia Supplement No. 1 are given. On the basis of these recommendations the HPLC method for the molecular mass distribution control in dextran 40 substance and preparations on its basis is developed and reproduced on different types of chromatographic systems. The analysis and attestation of *dextran 40 for system suitability test CRS SPU* was carried out. The methodical basis of validation of the procedure of the molecular mass distribution control in dextran 40 preparations is proposed. It was approved by the example of attestation of *dextran 40 for system suitability test CRS SPU* and may be used in other laboratories performing these preparations quality control.

Леонтьев Дмитрий Анатольевич (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Работает в лаборатории хроматографии ГП ГНЦЛС (с 1993). Ст. науч. сотр. Руководитель группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». К.фарм.н. (1997).

Гризодуб Александр Иванович. Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГП ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997).

Погпружников Юрий Васильевич. Начальник Управления инспектората по надлежущей производственной, дистрибьюторской практике, контролю соблюдения лицензионных условий Государственной службы лекарственных средств и изделий медицинского назначения. Д.фарм.н.

Іванов Лев Вагимович. Ст. преподаватель кафедры автоматизированных систем управления национального технического университета «ХПИ».

Аналитичний огляд

УДК 543.544:615.07

Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе и других областях анализа (обзор)

В обзоре рассмотрена недавно возникшая разновидность жидкостной хроматографии - мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ), новый вид хроматографии для фармацевтического анализа. Обсуждены принципиальные особенности МЖХ, ее преимущества и недостатки по сравнению с обращенно-фазовым и ион-парным вариантами жидкостной хроматографии. Рассмотрено влияние различных факторов на эффективность и селективность разделения, подходы к оптимизации в МЖХ. Рассмотрены эмпирические и физико-химические модели удерживания в МЖХ. Приведены примеры применения МЖХ в фармацевтическом, биофармацевтическом и некоторых смежных областях анализа.

1. Введение

Мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ) является альтернативой общепринятому методу обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФВЭЖХ). Она объединяет преимущества мицеллярных растворов с разделительной способностью жидкостной хроматографии.

В качестве подвижной фазы в МЖХ применяют водные растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ) с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ, смс). Фактически это означает, что в растворе наряду с мономерами ПАВ присутствуют мицеллы — микроагрегаты ПАВ, в которых сочетаются области гидрофобного (ядро мицеллы) и гидрофильного (мицеллярная поверхность) характера. Совокупность таких микроагрегатов образует мицеллярную псевдофазу.

ПАВ используются в еще одном варианте ОФВЭЖХ — ион-парной хроматографии, но в этом режиме концентрации ПАВ значительно ниже ККМ; подвижная фаза содержит только мономеры ПАВ и является однородной в отличие от микрогетерогенной подвижной фазы МЖХ.

Разнообразие возможных взаимодействий между сорбатами, мицеллами и неподвижной фазой (сорбентом) обеспечивает большое и разностороннее применение МЖХ и делает ее почти идеальной при анализе большого числа веществ. Благодаря двойственной природе ПАВ, обладающих как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами, возможно одновременное разделение смеси гидрофобных и гидрофильных

сорбатов. Особенно интересные возможности возникают при использовании мицеллярных элюентов в анализе растительных материалов, биологических образцов и других объектов, содержащих вещества, малорастворимые в воде. Пробоподготовка таких объектов анализа существенно упрощается за счет солюбилизации малорастворимых компонентов мицеллами ПАВ. Так, при анализе биологических материалов с мицеллярными подвижными фазами возможно прямое введение в колонку физиологических жидкостей, таких как мочевины, сыворотка и плазма, без отделения белковой матрицы [1, 2]. При этом матричные помехи устраняются за счет солюбилизации белков мицеллярными агрегатами, так как агрегаты мицелла — белок имеют большой размер и не удерживаются неподвижной фазой. Исключение трудоемкой стадии предварительной пробоподготовки при анализе биологических жидкостей определяет уникальное место МЖХ в мониторинге терапевтических средств и фармакокинетических исследованиях.

Применение мицеллярных элюентов позволяет не только улучшить разделение соединений, но и одновременно увеличить интенсивность аналитического сигнала за счет более эффективного детектирования, особенно при использовании флуоресцентного или фосфоресцентного детекторов [1]. При градиентном элюировании появляется возможность применения электрохимического детектора. Мицеллярные растворы ПАВ дешевы и нетоксичны.

Использование индивидуальных («чистых») растворов ПАВ в качестве мицелляр-

ных элюентов не обеспечивало хроматографической эффективности МЖХ, сопоставимой с ОФ ВЭЖХ; элюирующая сила таких растворов во многих случаях оказывалась слишком низкой. Положение изменилось, когда в растворы ПАВ стали вводить органические растворители — алифатические спирты, ацетонитрил, тетрагидрофуран, которые модифицируют свойства мицеллярных растворов ПАВ и повышают их элюирующую силу.

Мицеллярные элюенты, содержащие ПАВ и органический растворитель-модификатор, называют гибридными или модифицированными мицеллярными элюентами; именно они составили основу развития современной МЖХ.

Следует отметить, что в МЖХ требуются намного меньшие количества органических растворителей, чем в традиционных вариантах ВЭЖХ. Поэтому к преимуществам МЖХ относится также значительное снижение токсичности и воспламеняемости подвижной фазы, что делает анализ более экологичным, а уменьшение расхода реактивов заметно снижает стоимость анализа [1,3,4].

Положение (удерживание) и форма (эффективность) хроматографического пика в большей степени зависят от природы и концентрации ПАВ и органического модификатора, но также на удерживание и эффективность могут оказывать влияние рН подвижной фазы, температура и ионная сила. Действие влияющих параметров может быть смоделировано, что позволит оптимизировать условия разделения смеси веществ.

Несмотря на то, что метод МЖХ достаточно новый, уже имеется ряд статей обзорного характера [1, 5-9], в том числе и единственный обзор на русском языке [4]. Опыт двадцатилетнего развития МЖХ обобщен в вышедшей в 2000 году монографии [3] - первой, целиком посвященной этой разновидности метода жидкостной хроматографии.

Цель данного обзора — познакомить хроматографистов Украины, прежде всего работающих в области фармацевтического анализа, с развивающимся и перспективным методом мицеллярной жидкостной хроматографии. В обзоре рассмотрены модели удерживания, влияние различных факторов на эффективность и селективность разделения, проблемы оптимизации в МЖХ; даны примеры применения МЖХ в фармацевтическом и некоторых смежных областях анализа.

2. Специфика неподвижной и подвижной фаз в МЖХ

Неподвижная фаза

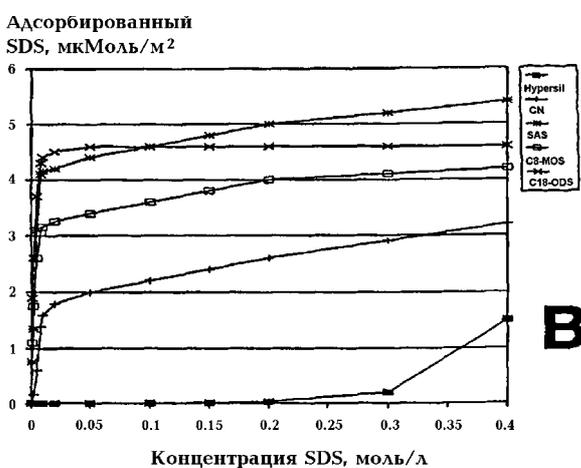
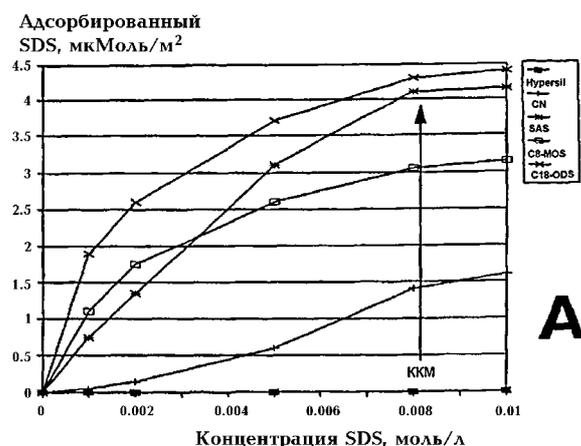
При пропуске мицеллярного элюента поверхность неподвижной фазы модифицируется, адсорбируя частицы ПАВ, и ее состояние существенно отличается от состояния такой же неподвижной фазы, используемой в обращенно-фазовом варианте жидкостной хроматографии.

Адсорбция ПАВ на сорбентах различных типов — С18, С8, CN, ионообменных сорбентах и чистом силикагеле изучалась как при использовании ПАВ в качестве ион-парных реагентов (при концентрациях ниже ККМ), так и в варианте МЖХ [10-15]. На Рис. 1 и Рис. 2 приведены изотермы адсорбции додецилсульфата натрия (SDS) и цетилпиридиния бромид (СТАВ) на сорбентах с различными привитыми группами: (А) — в режиме ион-парной хроматографии (концентрация ПАВ ниже ККМ); (В) — в режиме МЖХ (концентрация ПАВ выше ККМ).

Характер изотерм адсорбции заметно меняется при переходе к мицеллярным растворам. При концентрациях ПАВ ниже ККМ для привитых сорбентов наблюдается экспоненциальная зависимость (А). Адсорбция ПАВ из мицеллярных растворов на тех же сорбентах сначала резко усиливается с ростом концентрации ПАВ, а затем достигает «насыщения» (зависимости В на Рис. 1 и Рис. 2). Уменьшение наклона изотерм адсорбции при переходе из домицеллярной области в мицеллярную объясняется тем, что в мицеллярной области концентрация адсорбируемых мономеров ПАВ мало меняется с ростом общей концентрации ПАВ. Мицеллы ПАВ являются своеобразной буферной системой, стабилизируя концентрацию мономеров на уровне ККМ.

Эти особенности мицеллярных растворов и адсорбции ПАВ на неподвижной фазе создают преимущества МЖХ по сравнению с ион-парной хроматографией. В МЖХ лучше воспроизводятся хроматографические характеристики, стационарная фаза почти не нуждается в уравнивании, возможно градиентное элюирование, применение которого в ион-парной хроматографии ограничено необходимостью длительной регенерации колонки [1].

Рисунок 1

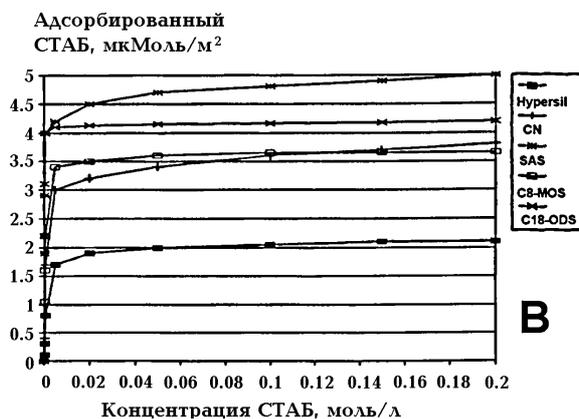
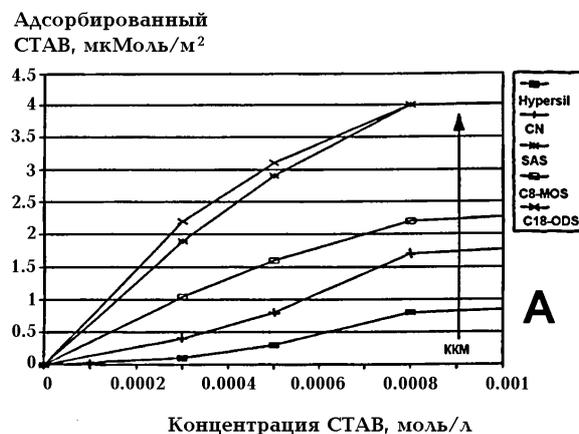


Адсорбционные способности различных фаз к SDS для (А) ион-парной хроматографии и (В) мицелярной хроматографии

Особенно четко выраженные плато наблюдаются при адсорбции из мицелярных растворов ПАВ на наименее полярной неподвижной фазе С18 (Рис. 1 и Рис. 2). Адсорбция обусловлена взаимодействием гидрофобных углеводородных радикалов ПАВ с привитыми алкильными радикалами сорбента, и появление плато соответствует тому, что адсорбированные частицы ПАВ покрывают практически все октадецильные группы. Как показали Ху и Хаддад [16], на поверхности октадецил-силикагеля массовая доля адсорбированного SDS достигает 16.5 %, что примерно соответствует среднему значению соотношения C/Si в исходном октадецилсиликагеле (17.1 %). Это свидетельствует о высокой степени покрытия октадецильных групп неподвижной фазы адсорбированным ПАВ и подтверждает высказанные ранее представления о том, что поверхность неподвижной фазы С18 представляет собой слой адсорбированного ПАВ [17].

Ионные (полярные) головки ПАВ сориентированы в сторону жидкой фазы, делая поверхность неподвижной фазы более гидрофильной по сравнению с исходным привитым сорбентом.

Рисунок 2



Адсорбционные способности различных фаз к СТАВ для (А) ион-парной хроматографии и (В) мицелярной хроматографии

Бертонд с соавторами [10] показали, что адсорбция SDS на поверхности силикагеля с привитыми алкильными группами С8 и С18 обратно пропорциональна плотности привитых групп на поверхности сорбента, тем меньше адсорбция ПАВ.

На чистом силикагеле ПАВ адсорбируются значительно слабее. Адсорбция анионного SDS (Рис. 1), становится заметной лишь при концентрациях выше 0.3 моль/л. В то же время катионный СТАВ заметно адсорбируется уже в домицелярной области. Отсюда следует, что адсорбция ПАВ на чистом силикагеле обусловлена электростатическими взаимодействиями, и на поверхности такой неподвижной фазы первоначально оказываются гидрофобные углеводородные радикалы

ПАВ. Как показали Баккер и соавторы, при высоких концентрациях катионных ПАВ на поверхности силикагеля образуются более сложные агрегаты частиц ПАВ (адмицеллы, гемимицеллы, бислои, обратные гемимицеллы) [18]. Адсорбция катионных и неионогенных ПАВ на силикагеле зависит от числа и силы адсорбционных центров: поверхностная агрегация сопровождается адсорбцией ПАВ на сильных адсорбционных центрах силикагеля [18].

В дальнейшем будут рассматриваться только неподвижные фазы на основе привитых сорбентов.

При введении в мицеллярный элюент органических растворителей-модификаторов неподвижная фаза претерпевает дальнейшую модификацию. Молекулы органического растворителя также способны адсорбироваться на поверхности, возможно, вытесняя частицы ПАВ.

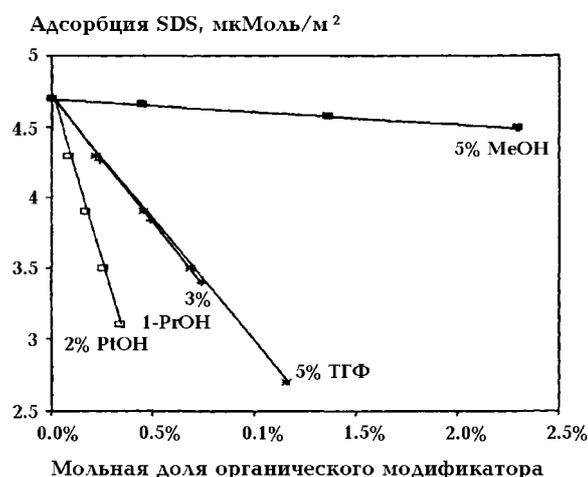
На Рис. 3 показана адсорбция SDS на поверхности сорбента Hypersil ODS в зависимости от мольной доли органических модификаторов в подвижной фазе. Так, при использовании 1-пентанола в качестве органического модификатора, количество SDS, адсорбированного на поверхности сорбента снижается с 4,7 мкмоль/м² (при отсутствии модификатора) до 3,9 мкмоль/м² при мольной доле 1-пентанола в растворе около 1 %.

Методами ИК-спектроскопии было показано, что поверхность привитого силикагеля при использовании гибридных подвижных фаз представляет собой структуру состава:

органический модификатор – ПАВ – привитая фаза [12, 19]. Авторы показали, что присутствие алифатических спиртов от 1-пропанола и выше приводит к образованию на поверхности силикагеля с привитыми С18 группами монослоя ПАВ, модифицированного спиртом. При этом гидроксильные группы спирта ориентированы к водной фазе.

Конкуренция между молекулами спирта и мономерами ПАВ на адсорбционных центрах приводит к уменьшению количества адсорбированного ПАВ на поверхности сорбента, что сопровождается уменьшением удерживания нейтральных органических веществ [16].

Рисунок 3



Адсорбция SDS на поверхности сорбента Hypersil ODS в зависимости от мольной доли органического модификатора в подвижной фазе

Таблица 1
ПАВ, используемые в МЖХ

Тип ПАВ	Название	ККМ, мМ	Литература
анионное	додецилсульфат натрия, SDS	7.5-8.1 [22]	23, 27-40
	тетрадецилсульфат натрия, NaTDS	2.1 [24]	
	додецилсульфонат натрия, SDSO	9.3 [24]	
	перфтороктилсульфонат лития, LiPFOS	6.72 [25]	
катионное	цетилтриметиламмоний бромид, СТАВ	0.92 [26]	27
	цетилтриметиламмоний хлорид, СТАС	1.3 [26]	
	додецилтриметиламмоний бромид, СТАВ	15 [22]	
неионное	полиоксиэтилен(23)додеканол, BRIJ 35	0.1 [22, 5]	41-44
	полиоксиэтилен[20]сорбитанмоноолеат, Tween 80	0.01 [26]	45
	полиоксиэтилен[20]сорбитанмонолаурат, Tween 20	0.059 [26]	
	Triton X-114		46
цвиттерионное	N-додецил-N,N-диметиламмоний-3-пропансульфонат, Сульфобетаин SB-12	3.3 [26]	
	3-(3-хлорамидопропил)диметиламмоний-3-пропансульфонат, CHAPS	4.2-6.3 [26]	

* Приведены ссылки на работы, в которых использованы мицеллярные элюенты на основе соответствующего ПАВ

Подвижная фаза

Для создания мицеллярных элюентов используются растворы ПАВ с концентрацией выше ККМ. Удобными для МЖХ являются ПАВ с невысокими значениями ККМ и чисел агрегации (Табл. 1). Точка Крафта должна быть значительно ниже, чем окружающая температура.

Выбор ПАВ с подобными мицеллярными характеристиками направлен, прежде всего, на создание не слишком «вязкого» элюента (размер микроагрегатов не должен превышать нескольких нанометров). Повышенная вязкость подвижной фазы может привести к нежелательно высокому давлению в колонке, а большие размеры микроагрегатов — к заметному светорассеянию в рабочем диапазоне УФ - видимый свет при использовании детекторов по светопоглощению [1]. Для создания подвижной фазы обычно требуется гораздо меньшее количество ПАВ (концентрации обычно ниже 0.2 моль/л), чем содержание органического растворителя в обращенно-фазовой хроматографии при аналогичных разделах.

Широкое распространение в МЖХ получили анионные ПАВ — додецилсульфат натрия, тетрадецилсульфат натрия, додецилсульфонат натрия [20] и перфтороктилсульфонат лития [21]. В преобладающем большинстве работ по МЖХ используется додецилсульфат натрия. Анализ более чем 40 публикаций по МЖХ за последние 4 года показал, что SDS использовали в 80 % случаев.

В отличие от традиционной обращенно-фазовой хроматографии, где водно-органическая подвижная фаза является гомогенной, мицеллярные элюенты являются микрогетерогенными и состоят из двух отдельных фаз: амфифильные мицеллярные агрегаты (мицеллярная псевдофаза) и водная или водно-органическая фаза. В объеме последней находятся мономерные ПАВ с концентрацией, равной ККМ. Разделяемые вещества (сорбаты) преимущественно солюбилизируются внутри или на поверхности мицеллярных микроагрегатов. При этом сорбаты, локализованные в мицеллах, оказываются в микроокружении, которое сильно отличается по полярности и вязкости от микроокружения в объеме раствора. Это отражается в изменении физико-химических свойств сорбатов под действием мицелл, таких как растворимость, кислотность, фотофизические свойства, а также скорости реакций и хромато-

графическое поведение. Как мицеллообразование, так и солюбилизация являются динамическими процессами.

Вторым компонентом мицеллярного «гибридного» элюента являются органические растворители — алифатические спирты от метанола до октанола и/или их смеси [47-49], ацетонитрил [34, 47], тетрагидрофуран [50,51] и другие органические растворители [30]. Как правило, используются нормальные спирты, известно использование изопропанола [52]. Данных об использовании разветвленных изомеров среднецепочечных спиртов мы в литературе не обнаружили; по-видимому, впервые возможность применения изоспиртов исследована в нашей работе [49].

Добавки органических растворителей влияют на характеристики мицеллообразования ПАВ и режим мицелл [53]. Методами рКа-проб [49, 54, 55, 56], потенциометрии [57], хроматографии [58] и методом светорассеивания [59] изучено мицеллообразование SDS в присутствии алифатических спиртов. Установлено, что метанол является единственным спиртом, добавки которого увеличивают ККМ SDS [47]. Добавки остальных алифатических спиртов снижают ККМ SDS, причем эффект тем заметнее, чем длиннее углеводородный радикал и выше концентрация спирта. Судя по литературным данным [47, 60], одинакового снижения ККМ SDS можно достичь введением 15 % пропанола, 5 % бутанола или 1 % пентанола.

ККМ ионогенных ПАВ заметно уменьшаются даже при небольшом содержании длинноцепочечных спиртов в мицеллярном растворе, что иллюстрируют данные Табл. 2.

Различный характер влияния спиртов на ККМ можно объяснить следующим образом. Поскольку метанол является наиболее полярным из всех спиртов, он лучше сольватирует мономерные ПАВ, повышая их растворимость в воде, что и приводит к росту ККМ SDS, особенно резко в диапазоне объемных долей спирта от 12 % до 20 % [47]. Аналогичным образом действует на ККМ ацетонитрил, сходный с метанолом по структуре и полярности. Этанол и пропанол, которые смешиваются с водой, в мицеллярных системах находятся в основном вне мицелл, в объеме водной фазы. Вероятно, их влияние на мицеллярную поверхность выражается в основном в снижении диэлектрической проницаемости раствора, что ослабляет взаимное отталкивание ионных головок ПАВ. Это способствует мицелло-

Таблица 2

Значения ККМ додецилсульфата натрия в присутствии спиртов при температуре 30 °С

Спирт	$\Phi_{\text{спирта}}, \%$	ККМ ¹ , ммоль/л	ККМ ² , ммоль/л	ККМ ³ , ммоль/л
-	-	6.68 ± 0.06	6.8 ± 0.2	8.1
1-BuOH	1.0	2.40	2.2	6.0
	2.0	1.60	1.8	4.8
	4.0	1.11	1.2	3.2
	6.0	0.92	0.9	2.8
	8.0	0.82	-	-
1-PtOH	0.1	2.66	-	-
	0.5	2.21	1.7	5.6
	1.0	0.92	0.9	4.8
	1.5	0.83	0.83	3.1
	2.0	0.81	-	2.9
	2.5	-	-	2.7
iso-PtOH	0.5	3.02	-	-
	1.0	2.07	-	-
	1.5	1.94	-	-
	2.0	1.55	-	-

¹ – потенциометрия, ² – кондуктометрия [61], ³ - по данным о поверхностном натяжении [47]

образованию, и сопровождается некоторым уменьшением числа агрегации и ККМ [47].

Молекулы среднецепочечных спиртов, вызывающие существенное снижение ККМ, менее полярны и внедряются в мицеллы ПАВ. Так, константа распределения 1-пентанола между водой и мицеллярной псевдофазой SDS равна 16 [62]. Мицеллярно-связанные молекулы пентанола погружены углеводородной частью в ядро агрегата, а их полярные группы оказываются в слое Штерна на поверхности мицеллы, что приводит к разбавлению ионогенной составляющей мицеллы и, следовательно, к уменьшению числа агрегации и снижению ККМ [63-65].

Высокие концентрации органических растворителей подавляют мицеллообразование. Мицеллы не образуются при концентрации пропанола свыше 23 %, бутанола – свыше 27.5 % [3]. Октанол, гексанол и деканол, отличающиеся особенно низкой растворимостью в воде, неудобны для использования в качестве органических модификаторов мицеллярного элюента из-за возможности образования эмульсий.

Специфическое влияние на ККМ SDS оказывает тетрагидрофуран: в диапазоне объемных долей от 0 % до 5% он вызывает некоторое снижение ККМ (как малополярные спирты), дальнейший рост его концентрации сопровождается увеличением ККМ (как в случае более полярного метанола). Специфика

влияния тетрагидрофурана объясняется его циклическим строением; по-видимому, встраивание молекулы тетрагидрофурана в мицеллярную структуру стерически затруднено [47].

Таким образом, влияние органического растворителя в МЖХ носит существенно иной характер по сравнению с ОФ ВЭЖХ и выражается, главным образом в модификации мицеллярных микроагрегатов. Неудивительно поэтому, что принцип выбора растворителя на основе треугольника селективности Снайдера, принятый в обращенно-фазовой хроматографии, в МЖХ оказался неприменимым.

Влияние природы органического растворителя на хроматографическое поведение в МЖХ изучено на примере бензола и 2-этилантахинона [66]. Как видно из Табл. 3, при использовании таких разных, по классификации Снайдера, растворителей как метанол, ацетонитрил и тетрагидрофуран, коэффициенты емкости бензола различаются в пределах 10 % (7.0; 6.8; 6.1, соответственно), 2-этилантахинона — в пределах 30 % (27.3; 20.2; 16.8, соответственно) [66]. В то же время одноатомные спирты, относящиеся по Снайдеру к одному типу растворителей, вызывают более заметные изменения характеристик удерживания, которые уменьшаются в ряду: метанол > этанол > пропанол > бутанол > пентанол > гексанол.

Таблица 3

Эффект влияния органических модификаторов на коэффициент емкости (k') бензола и 2-этилантрахинона на колонке Astec C18

Подвижная фаза: 0.285 M SDS с 5 % (об/об) органического модификатора [66]

Органический модификатор	k' бензола	k' 2-этилантрахинона	Органический модификатор	k' бензола	k' 2-этилантрахинона
модификатора нет	7.1	37.1	1-пентанол	4.7	7.3
метанол	7.0	27.3	2-пентанол	5.0	8.0
этанол	6.5	20.6	1-гексанол	4.8	6.3
1-пропанол	5.7	13.2	2-гексанол	4.6	6.3
2-пропанол	5.8	15.7	циклогексанол	5.1	9.2
2-метил-1-пропанол	6.1	14.2	1-гептанол*	6.5	27.6
1-бутанол	5.1	9.45	1,2-пропандиол	7.5	33.5
2-бутанол	5.8	11.73	2,3-бутандиол	7.2	28.5
2-метил-1-бутанол	4.7	7.75	ацетонитрил	6.1	16.8
3-метил-2-бутанол	4.8	7.6	диметилсульфоксид	6.4	22.1
тетрагидрофуран	6.8	20.2	формамид	8.0	37.3

* - содержание 1-гептанола в подвижной фазе 0.12 %

Здесь при переходе от метанола к гексанолу значение коэффициента емкости бензола уменьшается на 30 %, 2-этилантрахинона — более чем в 4 раза.

Наблюдаемый ряд селективности спиртов коррелирует с их способностью проникать в мицеллы. При этом уменьшается плотность суммарного электрического заряда на мицеллярной поверхности ионных ПАВ, что способствует массопереносу гидрофобных сорбатов, и, следовательно, уменьшению их времен удерживания.

Для выбора наиболее подходящего модификатора подвижной фазы в МЖХ предложено руководствоваться данными о гидрофобности разделяемых соединений [66]. В соответствии со значениями коэффициентов распределения этих соединений в среде октанол-вода ($P_{o/w}$) сформулированы следующие рекомендации по выбору растворителя-модификатора: 1) пропанол удобно использовать при разделении полярных соединений, попадающих в диапазон $-1 < \log P_{o/w} < 2$ (аминокислоты, белки [32, 60], сульфонамиды [67], фенольные антиоксиданты [68], катехоламины [69]); 2) введение бутанола ($< 10\%$) может быть полезно для менее полярных веществ с $1 < \log P_{o/w} < 3$ (β -блокаторы [70, 71], фенетил-амины [72]); 3) пентанол ($< 6\%$) более удобен для достаточно гидрофобных соединений с $\log P_{o/w} > 3$ (кортикостероиды [73], барбитураты [74], диуретики [60], стимуляторы [60], полиароматические углеводороды [75]).

Специфика МЖХ по сравнению с ВЭЖХ обнаруживается также и при анализе элюи-

рующей силы мицеллярной подвижной фазы.

В обращенно-фазовой хроматографии элюирующую силу водно-органической подвижной фазы принято описывать выражением:

$$\lg k' = \lg k'_0 - S\varphi, \quad (1)$$

где:

S — параметр силы растворителя;

k'_0 — коэффициент емкости сорбата в элюенте без органического модификатора.

Аналогичные уравнения получили распространение в МЖХ при описании элюирующей силы гибридных элюентов. Кхаледи и соавторы [75] исследовали влияние растворителя-модификатора на характеристики удерживания в МЖХ, на основе уравнения:

$$\lg k' = \lg k'_0 - S_{hyb}\varphi, \quad (2)$$

где:

S_{hyb} — параметр силы растворителя в гибридной мицеллярной системе;

k'_0 — коэффициент емкости сорбата в «чистом» водно-мицеллярном элюенте (т.е. без органического модификатора).

В традиционной обращенно-фазовой хроматографии значение S определяется природой сорбата: неполярные сорбаты характеризуются большими значениями S , и параметры их удерживания при увеличении доли органического модификатора изменяются более резко. В МЖХ значения S_{hyb} при использовании одного и того же модификато-

ра (2-пропанола) практически не зависят от природы разделяемых веществ, о чем свидетельствуют одинаковые значения угла наклона зависимостей (2) для шести алкилбензолов [75]. Основными факторами, определяющими значение S_{hyb} мицеллярного элюента, являются сольватирующая способность органического растворителя и степень его взаимодействия с мицеллами ПАВ. Высокие значения параметра S_{hyb} для бутанолов и пентанолов объясняются тем, что эти спирты в большей степени взаимодействуют с мицеллами, более эффективно сольватируют сорбаты и лучше конкурируют с мицеллами за взаимодействия с сорбатом, чем метанол [76].

Авторы монографии [3] провели аналогию между действием мицеллярной псевдофазы в МЖХ и действием органического растворителя в традиционной обращенно-фазовой хроматографии, поскольку для большинства сорбатов (взаимодействующих с мицеллами) наблюдается уменьшение удерживания при увеличении концентрации ПАВ в подвижной фазе ¹. В их работах влияние каждого из компонентов гибридного мицеллярного элюента описывали линейными зависимостями:

$$\lg k' = c_{01} + c_{11}\varphi ; \quad (3)$$

$$\lg k' = c_{02} + c_{12}[M] ; \quad (4)$$

где:

[M] – концентрация мицеллизированного ПАВ.

Ограниченность аналогии между МЖХ и ОФ ВЭЖХ проявляется в том, что экспериментальные данные МЖХ соответствуют линейным зависимостям (3-4) лишь на узких диапазонах концентрации ПАВ и объемной доли растворителя-модификатора, причем зависимость от [M] описывается хуже [66]. Попытки улучшить описание данных в МЖХ [50, 77-79] привели к эмпирическим уравнениям вида:

$$\lg k' = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi \quad (5)$$

или

$$\frac{1}{k'} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi . \quad (6)$$

Последнее выражение оказалось непригодным для описания и предсказания удерживания сильно гидрофобных веществ — полициклических ароматических углеводов-

Таблица 4

Значения элюирующей силы для мицеллярных (S_{hyb}) и водно-органических (S) подвижных фаз при разделении β -блокаторов на колонке Spherisorb ODS-2

Вещество	0.1 M SDS – 15 % пропанола $S_{hyb} = c_{11}$	0.15 M SDS – 10 % пропанола $S'_{hyb} = c_{12}$	32 % ацетонитрила* $S = c_1$	24 % ацетонитрила - 0.1 % триэтиламина* $S = c_1$
атенолол	-3.20	-4.53	-0.88	-2.97
прокталол	-2.41	-4.36	-0.78	-3.20
соталол	-2.82	-4.54	-0.77	-2.18
картеолол	-3.01	-4.72	-1.49	-4.40
надолол	-3.20	-4.23	-1.49	-4.79
пиндолол	-2.82	-4.47	-1.67	-3.45
ацебутолол	-2.34	-4.55	-2.29	-5.45
целипролол	-2.72	-4.28	-3.03	-6.70
эсмолол	-3.42	-4.54	-2.68	-5.55
метопролол	-3.31	-4.49	-2.32	-4.81
тимолол	-3.98	-4.42	-2.08	-4.18
биспролол	-3.19	-4.67	-3.00	-6.17
лабеталол	-3.34	-3.60	-3.15	-7.27
окспренолол	-3.66	-4.67	-2.93	-5.74
пропранолол	-3.73	-4.89	-3.58	-6.38
алпренолол	-4.00	-5.32	-3.56	-6.20

* – $\lg k' = c_0 + c_1\varphi$

¹ В обращенно-фазовой хроматографии ПАВ используются как ион-парные реагенты (при концентрации ПАВ ниже ККМ, где не существует мицелл). В этом случае наблюдается противоположный эффект — добавление ионного ПАВ увеличивает удерживание соединений, образующих ионные пары с мономерами ПАВ.

дов [57]. Поэтому авторы предложили ввести в уравнение (6) еще одно слагаемое ($c_4 \varphi^2$ или $c_4 [M] \varphi^{1/2}$), которое позволит улучшить описание удерживания для таких сорбатов в достаточно широком диапазоне концентраций модификатора и ПАВ.

В нашей работе [49] для пяти цитостатических антибиотиков — производных рубомицина показано, что лучшее описание зависимости удерживания от состава водно-органической мицеллярной подвижной фазы обеспечивает уравнение вида:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3\varphi^2. \quad (7)$$

Эмпирические коэффициенты в слагаемых, линейных по $[M]$ или φ (c_1 и c_2 , соответственно), используют для обсуждения и сопоставления элюирующей силы мицеллярных элюентов.

Проведено сравнение элюирующей силы мицеллярно-органических и водно-органических подвижных фаз при изучении удерживания 12 антигистаминных веществ и 14 β -блокаторов [31, 34, 78] (Табл. 4).

Из Табл. 4 видно, что для менее гидрофобных веществ (атенолол, прокталол, соталол) элюирующая сила мицеллярных подвижных фаз выше, чем при использовании водно-органических подвижных фаз в обращенно-фазовой хроматографии. Однако для более гидрофобных веществ (окспренолол, пропранолол) элюирующая сила примерно одинако-

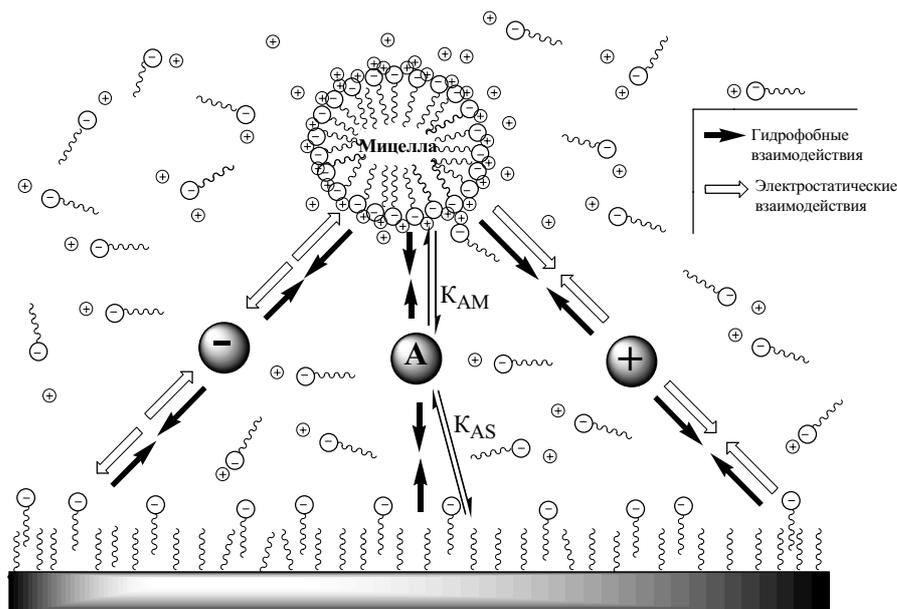
ва как для мицеллярных подвижных фаз, так и водно-органических фаз в ОФ ВЭЖХ. Элюирующая сила мицеллярной подвижной фазы в большей степени зависит от концентрации ПАВ, чем элюирующая сила водно-органической подвижной фазы в ОФ ВЭЖХ — от концентрации органического модификатора. Хроматографическое поведение β -блокаторов объяснено сильной их ассоциацией с мицеллярной псевдофазой SDS [34]. Установлено также, что в МЖХ разделение β -блокаторов мало зависит от типа используемого сорбента (Spherisorb ODS-2, XTerra C18), тогда как методом ОФ ВЭЖХ на разных сорбентах получаются существенно разные результаты; аналогичные отличия МЖХ и ОФ ВЭЖХ наблюдались при разделении других веществ и другими авторами [2, 3, 20].

Все это делает МЖХ во многих случаях более приемлемой для анализа по сравнению с традиционной обращенно-фазовой хроматографией.

3. Модели удерживания в МЖХ

Описание процессов в МЖХ гораздо сложнее, чем в традиционной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с водно-органическими растворителями, из-за ряда дополнительных взаимодействий сорбата как с подвижной, так и с неподвижной фазами (Рис. 4). Авторы монографии [3] называют

Рисунок 4



Взаимодействия различных веществ с мицеллой и неподвижной фазой в МЖХ

В центре — взаимодействия, описываемые трехфазными моделями

мицеллярную хроматографию отличным примером использования вторичных химических равновесий в жидкостной хроматографии. В качестве основного равновесия рассматривают распределение сорбата между подвижной и неподвижной фазами, в качестве вторичного — распределение в мицеллярную псевдофазу. На вторичное равновесие оказывают влияние различные факторы, такие как тип и концентрация ПАВ, вид органического модификатора (спирты или другие растворители), pH, солевые добавки. Это создает дополнительные возможности управления селективностью и эффективностью хроматографирования, но усложняет оптимизацию состава мицеллярного элюента.

Сорбаты в подвижной фазе могут взаимодействовать за счет электростатических взаимодействий с заряженной поверхностью мицеллы или за счет гидрофобных — с ее углеводородным ядром. Аналогичные взаимодействия имеют место при связывании сорбата «мицеллоподобной» поверхностью неподвижной фазы, модифицированной за счет адсорбции ПАВ.

Опыт построения теоретических основ МЖХ вплоть до 2000 года обобщен в монографии [3]. В последнее время в этой области появились дополнительные разработки [16, 49].

К числу эмпирических моделей удерживания в МЖХ следует отнести уже упоминавшиеся в предыдущем разделе аналоги классической элюационной модели — линейные уравнения (3-4) [1, 50, 80], применимые, однако, лишь в узких диапазонах концентраций ПАВ и модификатора, причем зависимость от концентрации ПАВ описывается хуже, чем зависимость от концентрации модификатора [50, 66, 80]. Уравнения (5-7) также являются эмпирическими, и их коэффициенты не имеют определенного физического смысла.

Армстронг и Стайн [81] предложили следующую классификацию разделяемых соединений в соответствии с их поведением в присутствии мицеллярной подвижной фазы:

- (а) вещества, связывающиеся мицеллами;
- (б) несвязывающиеся вещества;
- (в) антисвязывающиеся вещества.

С ростом концентрация мицелл в подвижной фазе уменьшается удерживание соединений, которые ассоциируют или связываются с мицеллами; остается неизменным удерживание соединений, которые не ассоциируют с мицеллами; удерживание антисвязывающихся веществ может увеличиваться. Пове-

дение, наблюдаемое чаще всего, свидетельствует о связывании сорбата мицеллами, тогда как антисвязывающиеся вещества встречаются довольно редко.

Ниже рассмотрим содержательные модели удерживания в МЖХ, основанные на представлениях о специфическом связывании сорбата мицеллярной псевдофазой.

Трехфазная модель

Армстронг и Ном [82] предложили трехфазную модель хроматографической системы, включающую стационарную фазу, объем водного растворителя и мицеллярную псевдофазу. Представления о трехфазной системе использованы в модели распределения Армстронга и Ном и моделях равновесий Арунъярнта - Клини-Лавы и Фолея. Джандера и Фишер [83] распространили положения трехфазной модели на случай антисвязывающихся сорбатов.

Уравнение Армстронга и Ном

Взаимодействия, происходящие в мицеллярной хроматографической системе, представлены на Рис.4. Армстронг и Ном [82] расширили на мицеллярные фазы классическую модель теоретических тарелок Мартина, Говарда, Синджа и Херриса [83]. Согласно трехфазной модели, удерживание сорбата контролируется тремя конкурирующими обратимыми равновесиями: (1) распределением (или связыванием) сорбата между водной фазой в объеме раствора и мицеллами, (2) распределением сорбата между водной фазой и неподвижной фазой, и (3) прямой перенос сорбата из мицелл на стационарную фазу. Равновесия распределения описываются тремя коэффициентами, соответственно P_{WM} , P_{WS} , P_{MS} . Коэффициенты P_{WS} и P_{WM} оказывают противоположное влияние на удерживание сорбатов: если преобладает P_{WS} , то время удерживания возрастает, если же больше величина P_{WM} , время удерживания уменьшается из-за увеличения распределения в мицеллах.

Исходя из значений коэффициентов P_{WM} и P_{WS} , выражены значения массовой доли сорбата в каждой фазе и на каждой теоретической тарелке. Коэффициент P_{MS} , характеризующий распределение сорбата между неподвижной фазой и мицеллами, не включался в модель, поскольку может быть получен комбинацией двух предыдущих ($P_{MS} = P_{WS}/P_{WM}$). Из выражения для максимально заполненной теоретической тарелки следует уравнение:

$$\frac{V_e - V_o}{V_S} = \frac{k'}{\phi} = \frac{P_{WS}}{1 + \nu(P_{WM} - 1)[M]}, \quad (8)$$

где:

- V_e – общий объем элюента, необходимый для элюирования сорбата с колонки;
 V_o – «мертвый объем» колонки;
 V_S – объем активной поверхности неподвижной фазы;
 ϕ – фазовое отношение;
 $[M]$ – концентрация ПАВ в подвижной фазе;
 ν – молярный объем мономеров ПАВ в мицелле (0.246 л/моль для SDS).

При отсутствии мицелл в подвижной фазе уравнение (8) переходит в уравнение распределения в традиционной обращенно-фазовой хроматографии:

$$V_e = V_o + V_S P_{WS}. \quad (9)$$

Уравнение Арунъярнта и Кли-Лав

Арунъярнт и Кли-Лав [84] использовали константы связывания вместо соответствующих коэффициентов распределения и представили равновесия в трехфазной системе как равновесия ассоциации:

а) ассоциация сорбата в объеме водного раствора (А) со связывающими участками неподвижной фазы (S):



б) ассоциация или связывание сорбата в объеме водного раствора с мономером ПАВ в мицелле подвижной фазы (M):



в) прямой перенос сорбата из мицеллы на стационарную фазу:



Третьим уравнением в этом подходе пренебрегали. Подстановка констант равновесий K_{WS} и K_{AM} в уравнение для коэффициента емкости приводит к выражению:

$$k' = \phi \frac{[AS]}{[A] + [AM]} = \frac{\phi K_{WS} [S]}{1 + K_{AM} [M]}. \quad (13)$$

где:

- $[S]$ – концентрация активных центров на поверхности неподвижной фазы;
 ϕ – фазовое отношение колонки. Последняя величина обычно постоянна и может быть включена в константу распределения K_{WS} . Константа K_{AM} относится к ассоциации сорбата с одной из частиц ПАВ в мицелле.

Могель Ху и Хаддад

Ху и Хаддад [16] учли прямой перенос сорбата из мицеллы на стационарную фазу (уравнение (12)), и представили коэффициент емкости уравнением:

$$k' = \frac{K_1 V_{SS} [S_S]}{V_M + K_2 V_{SM} [S_M]}, \quad (14)$$

где:

- K_1 – константа, характеризующая взаимодействие между сорбатом в подвижной фазе и ПАВ, адсорбированным на поверхности неподвижной фазы;
 K_2 – константа, характеризующая взаимодействие между сорбатом и ПАВ в подвижной фазе;
 V_{SS} – объем ПАВ, адсорбированного на неподвижной фазе;
 V_{SM} – объем ПАВ в подвижной фазе;
 $[S_S]$ – концентрация ПАВ, адсорбированного на неподвижной фазе;
 $[S_M]$ – концентрация ПАВ в подвижной фазе,
 V_M – объем подвижной фазы.

Полученное уравнение отличается от уравнения Арунъярнта (13) прежде всего выражением фазового отношения: в предыдущих моделях числитель фазового отношения представлял собой объем активной поверхности неподвижной фазы [84], в модели [16] числителем фазового отношения является объем ПАВ, адсорбированного на неподвижной фазе. Возможно, это отличие предлагаемой модели от остальных трехфазных моделей может обнаружиться при использовании сорбентов, поверхность которых не полностью покрыта адсорбированным ПАВ. Другая существенная особенность предлагаемой модели обнаруживается при варьировании содержания органического модификатора в мицеллярном элюенте. Из уравнения (14) следует выражение, в котором содержится масса ПАВ, адсорбированного на неподвижной фазе:

$$\frac{1}{k'} = \frac{V_M + K_2 V_{SM} [S_M]}{K_1 W_S} \quad (15)$$

где:

- W_S – масса ПАВ, адсорбированного на неподвижной фазе.

Экспериментально установлено изменение массы адсорбированного ПАВ при увеличении содержания растворителя; этот факт не учитывался в предыдущих моделях. Однако анализ предлагаемой модели затруднен некоторой неопределенностью исходных пред-

посылок и неполнотой представления результатов в статье [16]: непонятно, почему авторы приравнивают величины V_M и V_{SM} и называют их исключенным объемом колонки; не ясно, уменьшается или увеличивается масса адсорбированного ПАВ в присутствии спиртов.

Уравнение Фолей

Фолей [85] рассматривал ассоциацию между сорбатом в объеме водной фазы и мицеллами (уравнение (11)) как вторичное равновесие, влияющее на коэффициент емкости сорбата:

$$k' = \frac{1}{1 + K_{AM}[M]} k'_0, \quad (16)$$

где:

k'_0 — коэффициент емкости сорбата в отсутствии мицелл.

Это уравнение аналогично предыдущим: коэффициент емкости несвязанного сорбата k'_0 , совпадает с произведениями ϕP_{WS} в уравнении (8) и с ϕK_{AS} в уравнении (13); константа K_{AM} соответствует такой же константе в уравнении (13) и выражению $v(P_{WM}-1)$ в уравнении (8), когда объем водной фазы приравнивается к общему объему подвижной фазы.

Из уравнений (8, 13, 14, 16) следует, что величина, обратная коэффициенту емкости, должна линейно зависеть от концентрации ПАВ:

$$\frac{1}{k'} = a + b[M], \quad (17)$$

где:

a и b — коэффициенты, значения которых могут быть определены из эмпирических зависимостей в «чистых» мицеллярных растворах или при фиксированной концентрации модификатора.

Зависимость коэффициента емкости от содержания модификатора

Учет второй переменной — объемной доли модификатора — основан на представлении о том, что растворитель-модификатор влияет на распределение сорбата в трехфазной системе и концентрация сорбата в каждой из фаз изменяется по сравнению с «чистым» раствором ПАВ. В серии работ Гарсии-Алварез-Кокуи [57, 78-80, 86, 87] предложено считать, что относительное изменение концентрации сорбата под влиянием модификатора по сравнению с «чистым» мицеллярным раствором пропорционально объемной доли модификатора в подвижной фазе. Коэффици-

циенты пропорциональности K_{AD} , K_{MD} и K_{SD} , характеризуют относительное изменение концентрации сорбата в водной фазе, мицеллярной псевдофазе и на неподвижной фазе, соответственно [9].

Если считать, что под влиянием модификатора изменяются концентрации сорбата только в водном растворе и мицеллярной псевдофазе, из уравнения (13) следует уравнение:

$$k' = \frac{K_{AS} (1/(1 + K_{AD}\phi))}{1 + K_{AM} ((1 + K_{MD}\phi)/(1 + K_{AD}\phi))} [M] \quad (18)$$

Если учитывать также изменение концентрации сорбата на поверхности неподвижной псевдофазы, из уравнения (13) следуют уравнения:

$$k' = \frac{K_{AS} ((1 + K_{SD}\phi)/(1 + K_{AD}\phi))}{1 + K_{AM} ((1 + K_{MD}\phi)/(1 + K_{AD}\phi))} [M] \quad (19)$$

$$k' = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM} \left(\frac{1 + K_{MD1}\phi + K_{MD2}\phi^2}{1 + K_{AD1}\phi + K_{AD2}\phi^2} \right)} [M] \quad (20)$$

Уравнения (18)-(20) являются нелинейными функциями 4-6 параметров; их определение для каждого сорбата требует большого количества экспериментальных данных.

Авторы монографии [3] приводят условия, при которых трехфазные модели адекватно отображают процессы в МЖХ:

1) небольшие количества хроматографируемого сорбата не влияют на ККМ и числа агрегации мицелл;

2) связывание ПАВ неподвижной фазой заметно не влияет на время удерживания сорбата или если все-таки влияет, то это связывание достигает уровня насыщения при достижении ККМ или выше ее;

3) при увеличении концентрации мицелл не меняются их числа агрегации и геометрия;

4) сорбат связывается мицеллой в «комплекс» состава 1:1 (по-видимому, речь идет о соотношении сорбат-отдельная частица ПАВ в мицелле, согласно уравнению (11)).

В случаях, когда перечисленные допущения не выполняются, наблюдается существенное отклонение рассчитанных значений коэффициентов емкости от экспериментально полученных.

На самом деле, третье предположение верно лишь в узких диапазонах концентраций ПАВ и сомнительно для гибридных мицеллярных элюентов. Известно, например,

что с увеличением концентрации пентанола увеличивается доля мицеллярно связанного спирта, что снижает силу электростатического отталкивания ионных головок ПАВ и приводит к изменению размера и формы мицелл. Так, в мицеллярном растворе 0.2 моль/л SDS при увеличении объемной доли 1-пентанола от 0.33 % до 1.92 % число молекул спирта в мицелле увеличивается от 5 до 37, а число агрегации уменьшается от 79 до 62 [88].

По данным Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy рассчитаны средние значения радиусов ядер мицелл SDS (0.2 моль/л) при содержании пентанола от 0 моль/л до 1 моль/л [63]. Оказалось, что мицеллы остаются сферическими, если содержание спирта превышает концентрацию ПАВ не более чем на 50 %. Дальнейшее увеличение концентрации спирта промотирует удлиненную форму агрегатов - среднее между палочкой и эллипсом. В 0.04 моль/л растворе SDS добавка 1.5 % 1-пентанола вызывает такую же перестройку мицелл в палочкообразные агрегаты, как добавление хлорида натрия с концентрацией 0.8 моль/л [64, 89].

Дополнительное изменение размеров и состава смешанных мицелл SDS-1-PtOH происходит при введении в систему солей. Так, в работе [90] показано, что при введении 0.1 моль/л NaCl в раствор 0.05 моль/л SDS — 2 % пентанола общее число мономеров в мицелле увеличивается на 20 %, из них третью часть составляют молекулы спирта.

Модель изменения микроокружения сорбата

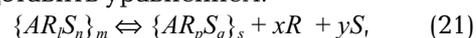
В предыдущих моделях хроматографического удерживания не учитывались мицеллярные характеристики элюента и их изменение при изменении состава — концентрации ПАВ, природы и концентрации модификатора. Поскольку специфика МЖХ обусловлена именно наличием мицелл, представляют интерес такие физико-химические модели удерживания, параметрами которых являются непосредственно характеристики мицеллообразования, и которые отражают закономерности изменения мицеллярных свойств элюента при изменении его состава. Нам удалось связать параметры удерживания с характеристиками мицеллообразования, рассматривая, как изменяется микроокружение сорбата при переходе из подвижной фазы на неподвижную [91]. Полученная модель удерживания может быть названа моделью изменения микроокружения сорбата в МЖХ.

По аналогии с моделью Мураками для обращенно-фазовой хроматографии [92], где рассматривалось изменение количества растворителя в сольватной оболочке сорбата, нами рассмотрено микроокружение сорбата в подвижной и неподвижной фазах, создаваемое частицами каждого из компонентов мицеллярного элюента. Исходные предпосылки модели:

1) сорбат *A* в подвижной фазе находится в мицеллах, содержащих органический модификатор, и «сольватирован» в мицеллярной псевдофазе *l* молекулами органического модификатора (*R*) и *n* мономерами ПАВ (*S*);

2) в «полумицелле» на поверхности неподвижной фазы сорбат «сольватирован» *p* молекулами органического модификатора и *q* мономерами ПАВ.

Изменение количества молекул органического модификатора и ПАВ в окружении сорбата при переходе последнего из подвижной фазы на поверхность неподвижной можно представить уравнением:



где: $x = l - p$, $y = n - q$;

коэффициенты *x* и *y* могут принимать как положительные, так и отрицательные значения, индексы *m* и *s* относятся к подвижной и неподвижной фазам, соответственно.

Коэффициент емкости равен произведению коэффициента распределения и фазового отношения колонки ϕ :

$$k = \frac{n_A^s}{n_A^m} = \frac{[AR_pS_q]_s}{[AR_pS_n]_m} \phi, \quad (22)$$

а коэффициент распределения может быть выражен из уравнения закона действующих масс (ЗДМ) для равновесия (21):

$$K = \frac{[AR_pS_q]_s [R]^x [S]^y}{[AR_pS_n]_m}, \quad (23)$$

где:

$[S]$ и $[R]$ — равновесные концентрации мономеров ПАВ и спирта соответственно, отнесенные к объему всей подвижной фазы.

Тогда из уравнения (22) следует выражение для коэффициента емкости:

$$\lg k' = \lg K' - x \lg [R] - y \lg [S], \quad (24)$$

где:

$$\lg K' = \lg K + \lg \phi.$$

Дальнейший вывод уравнений основан на представлении равновесных концентраций мономеров ПАВ и молекул модификатора в подвижной фазе с использованием уравнений материального баланса и ЗДМ. С учетом реакции мицеллообразования:



$$[S] = cmc = \frac{K''}{\{C_s(1-\beta)\}^\beta}, \quad (26)$$

где:

β — степень связывания противоионов;

C_s — молярная концентрация ПАВ.

С учетом распределения модификатора между водной и мицеллярной фазой:

$$[R] = \frac{C_R}{1 + \frac{Pv_s(C_s - cmc)}{1 - v_s(C_s - cmc)}}, \quad (27)$$

где:

P — константа распределения модификатора;

v_s — объем мицеллярной псевдофазы, выраженный через мольный объем ПАВ;

C_R — молярная концентрация модификатора в водной фазе.

Окончательное выражение коэффициента емкости k' от концентрации ПАВ и органического модификатора имеет вид:

$$\lg k' = \text{const} - x \lg C_R + y \beta \lg C_s + x \lg \left(1 + \frac{Pv_s(C_s - cmc)}{1 - v_s(C_s - cmc)} \right) + y \beta \lg (1 - \beta) \quad (28)$$

Фиксированной концентрации одного из компонентов мицеллярного элюента соответствуют частные случаи зависимости (28):

при фиксированной концентрации модификатора:

$$\lg k' = \text{const}' + y \beta \lg C_s + x \lg \left(1 + \frac{Pv_s(C_s - cmc)}{1 - v_s(C_s - cmc)} \right), \quad (29)$$

где: $\text{const}' = \text{const} - x \lg C_R + y \beta \lg (1 - \beta)$,

а при фиксированной концентрации ПАВ — выражение:

$$\lg k' = \text{const}'' - x \lg C_R + y \beta \lg \{C_s(1 - \beta)\}, \quad (30)$$

где: $\text{const}'' = \text{const} + x \lg \left(1 + \frac{Pv_s(C_s - cmc)}{1 - v_s(C_s - cmc)} \right)$.

Согласно уравнениям (29) и (30), наличие второго компонента следует учитывать даже

при фиксированной его концентрации. Концентрация модификатора влияет на степень связывания противоионов мицеллами ПАВ, а концентрация ПАВ — на распределение модификатора между водной фазой и мицеллярной псевдофазой.

Модель проверена на экспериментальных данных по разделению пяти антибиотиков ряда рубомицина [49] с мицеллярной подвижной фазой на основе додецилсульфата натрия, модифицированного 1-пентанолом или изопентанолом. При наличии трех подгоночных параметров модель адекватно описывает экспериментальные данные в диапазоне концентрации SDS от 0.025 моль/л до 0.25 моль/л, и диапазоне объемной доли спирта от 0.5 % до 2.5-3 %. Следует отметить, что на столь широких диапазонах концентраций наблюдаются существенные отклонения экспериментальных данных от линейных зависимостей (3-6, 17).

Уравнение (28) получено при условии $C_s \cdot (1 - \beta) \gg \beta \cdot cmc$. Оно удовлетворительно выполняется уже при минимальной из исследуемых концентраций SDS: при $C_s = 0.025$ моль/л, $cmc = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $\beta = 0.6$ левая часть неравенства составляет 0.01, правая - $1 \cdot 10^{-4}$.

Знаки полученных оценок x и y (коэффициенты уравнения (21)) соответствуют тому, что переход сорбата из подвижной фазы на неподвижную сопровождается отщеплением молекул спирта-модификатора. Иными словами, соотношение спирт: ПАВ в «полумицеллах» неподвижной фазы меньше, чем в мицеллах подвижной фазы.

Модель позволяет прогнозировать эффекты замены модификатора и априорно оценивать возможные помехи за счет сопутствующих компонентов, влияющих на мицеллярные характеристики элюента.

4. Проблемы эффективности, селективности и оптимизации в МЖХ

Уже упоминавшуюся проблему низкой эффективности «чистых» растворов ПАВ в качестве мицеллярных элюентов можно объяснить сопротивлением массопереносу сорбата из мицеллярной псевдофазы элюента на неподвижную фазу [93, 94] и медленной десорбцией последнего с неподвижной фазы [95]. Авторы [95] показали, что для того, чтобы сорбат перешел из мицеллы в неподвижную фазу, необходима определенная ориентация мицеллы по отношению к неподвижной фазе. Для обратного перехода определен-

ной ориентации не требуется: сорбат может войти в мицеллу в любой точке.

Резкое улучшение эффективности и формы хроматографического пика при введении в состав подвижной фазы органических модификаторов, чаще всего спиртов, объясняется как увеличением растворимости сорбата в подвижной фазе, так и уменьшением сродства сорбата к поверхности неподвижной фазы, модифицированной ПАВ [30, 94].

Введение органического модификатора влияет не только на эффективность, но и на селективность разделения (Рис 5). Достаточно подробно изучено влияние нормальных спиртов на эффективность и селективность разделения в МЖХ. В некоторых случаях возможно и применение изоспиртов. Однако на примере разделения антибиотиков ряда рубомицина обнаружена неоднозначность влияния изоспиртов на эффективность и селективность [49]: в одних случаях замена нормального спирта разветвленным изомером сопровождалась улучшением эффективности и селективности, в других — ухудшением (Рис. 6). К сожалению, подробное исследование влияния изоспиртов на эффективность и селективность разделения различных классов соединений пока что не проводилось.

В работах [75, 96] различия селективности разделения в МЖХ и в обращенно-фазовой хроматографии проанализированы с точки зрения закономерностей изменения удерживания в гомологических рядах и при изменении структуры сорбата. В обращенно-фазовой хроматографии удерживание гомологов связано с числом атомов углерода следующим линейным соотношением:

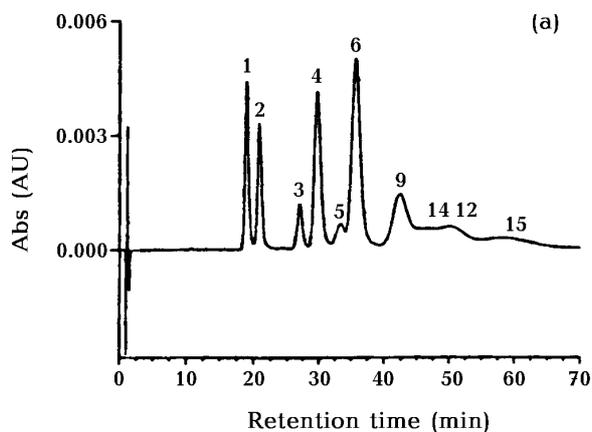
$$\lg k' = \lg \alpha(CH_2) \cdot n_c + \lg \beta \quad (31)$$

где:

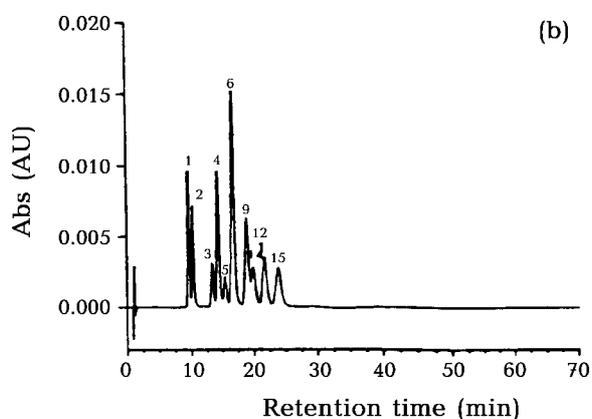
- n_c — число атомов углерода в гомологе;
- $\alpha(CH_2)$ — неспецифическая селективность по метиленовой группе (гидрофобная селективность);
- β — вклад в удерживание общих для данного гомологического ряда групп.

В МЖХ удерживание гомологов не соответствует линейной зависимости от числа углеродных атомов как при использовании «чистых», так и гибридных мицеллярных элюентов. Для гомологических серий *n*-алкилбензолов, 2-алкилантрахинонов и *n*-алкилфенолов в МЖХ зависимость $\lg k'$ от n_c удалось описать, добавив слагаемое, учитывающее ми-

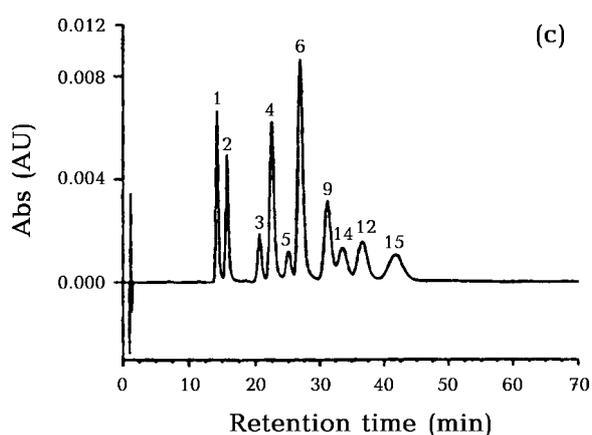
Рисунок 5



без модификатора



метанол

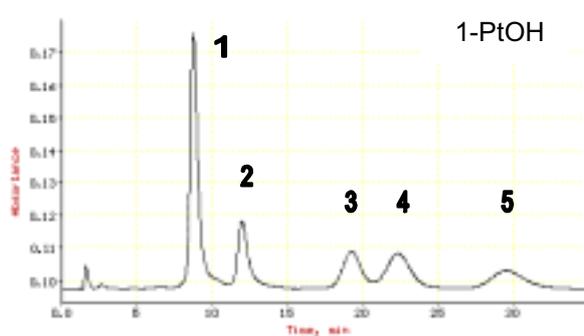


2-пропанол

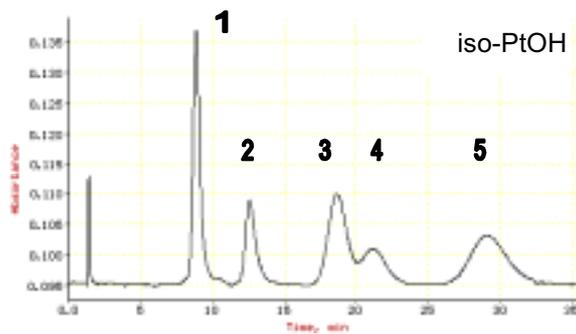
Хроматограммы разделения смеси полиароматических углеводородов (ПАУ) в зависимости от состава подвижной фазы

- (a) — 0.15 M SDS;
- (b) — 0.15 M SDS и 15 % метанол;
- (c) — 0.15 M SDS и 15 % 2-пропанол

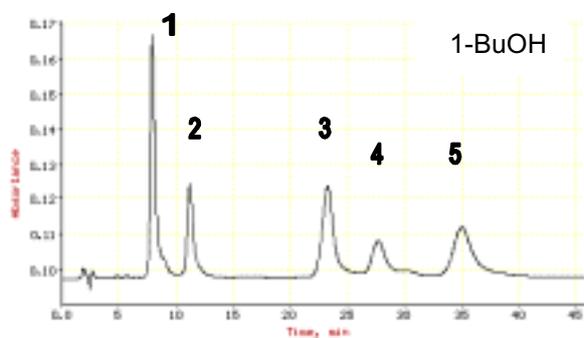
Рисунок 6



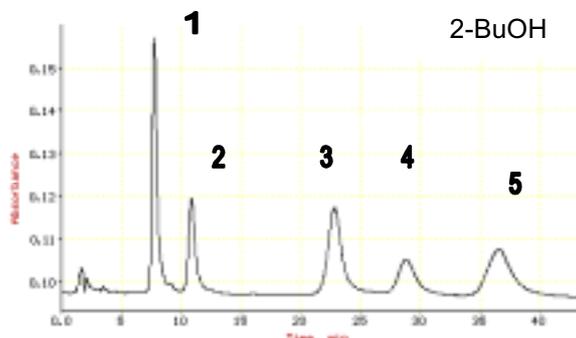
1000/1.12/1.00/0.89



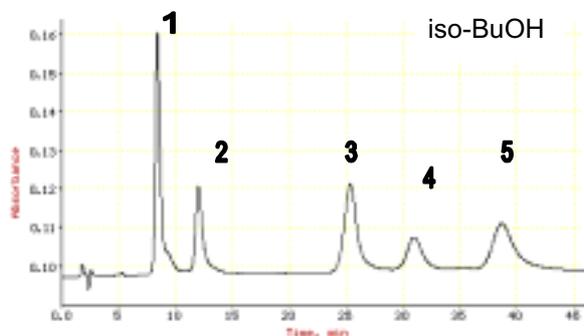
696/1.14/1.33/0.75



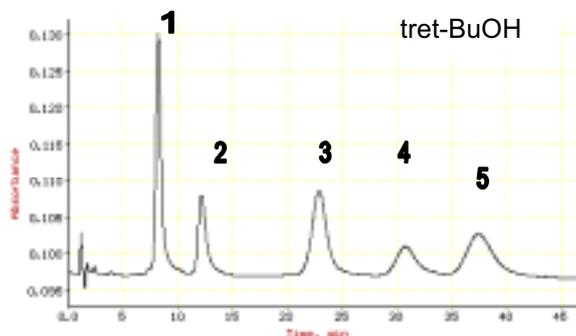
2434/1.37/1.07/1.22



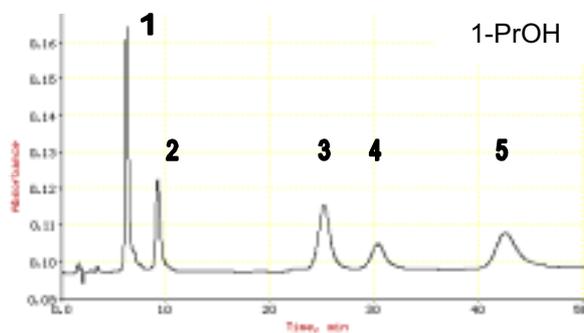
1665/1.18/1.41/1.39



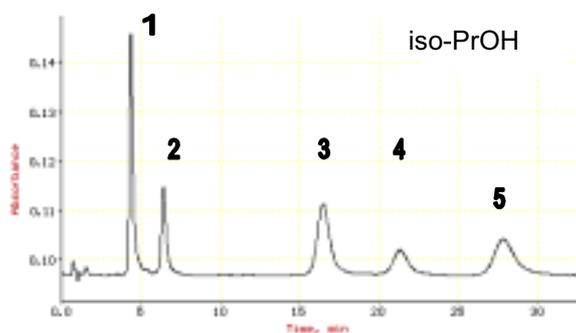
2366/1.28/1.15/1.45



1331/1.13/1.33/2.04

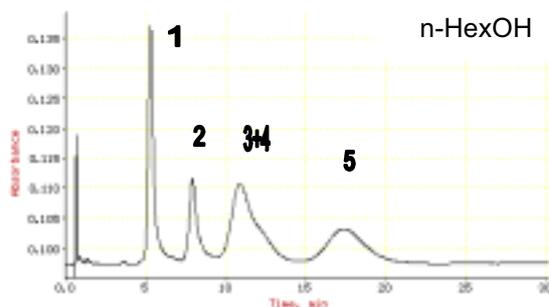


2424/1.09/1.44/1.59



2444/1.06/1.23/1.89

Рисунок 6 (продолжение)



384/1.21/1.05/

Влияние нормальных и изо-спиртов на времена удерживания, асимметрию пика и селективность (мицеллярный раствор – 0.05 M SDS).

Под рисунками указано: эффективность колонки по пику (5) / асимметрия пика (5) / степень разделения пиков (1) и (2) / степень разделения пиков (3) и (4). 1 – рубомицион; 2 – доксорубицион; 3 – доксорубицина гидрохлорид; 4 – эпирубицина гидрохлорид; 5 – рубомицина гидрохлорид.

целлярные взаимодействия каждого гомолога [75, 96]:

$$\lg k' = \lg \gamma \cdot n_c^2 + \lg \alpha(CH_2) \cdot n_c + \lg \beta \quad (32)$$

где:

γ – вклад в удерживание мицеллярных взаимодействий.

Обнаружена также специфика влияния функциональных групп на селективность разделения в ОФ ВЭЖХ и МЖХ. При разделении гомологов алкилфенилкетонов и алкилбензолов с использованием мицеллярных и водно-органических элюентов установлен разный характер зависимостей селективности по карбонильной группе $\alpha(CO)$ от числа атомов углерода (Рис. 7) [75, 96].

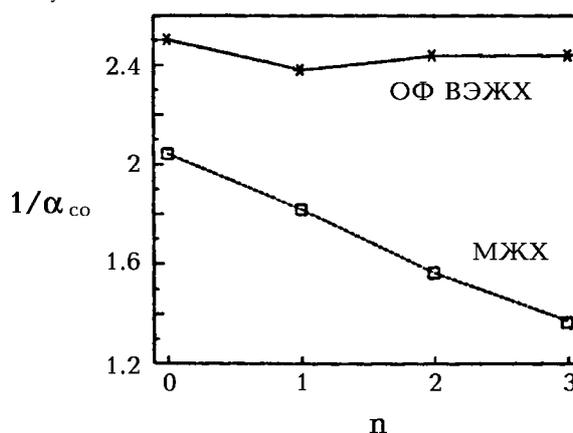
При использовании водно-органических элюентов селективность по карбонильной группе практически постоянна для гомологов с разным числом атомов углерода; для мицеллярных элюентов такая селективность зависит от длины цепи гомолога.

Основная причина различий селективности разделения в МЖХ и ОФ ВЭЖХ — неоднородность свойств мицеллярных микроагрегатов. Место локализации сорбата в мицелле зависит от гидрофобности вещества, и в данном мицеллярном элюенте разные гомологи могут оказаться в микроокружении с различной полярностью. Тогда разным гомологам серии соответствуют разные значения гидрофобной селективности $\alpha(CH_2)$, которая, как известно, обратно пропорциональна полярности микроокружения. Эта ситуация

сильно отличается от ситуации в гомогенных водно-органических фазах, где на все сорбаты воздействует одна и та же полярность подвижной фазы. То же различие можно увидеть и на Рис. 7: в водно-органической системе карбонильная селективность остается постоянной, тогда как в случае с мицеллярными элюентами она зависит от глубины погружения гомологов в мицеллу и, следовательно, от длины углеводородной цепи в гомологических сериях.

На эффективность и селективность разделения ионогенных сорбатов в МЖХ большое

Рисунок 7



Зависимость $\alpha(CO)$ от числа атомов углерода для МЖХ и ОФ ВЭЖХ [1]

$$\alpha_{CO} = \frac{k'(C_5H_6CO(CH_2)_nCH_3)}{k'(C_5H_6(CH_2)_nCH_3)}$$

влияние оказывает рН подвижной фазы, тем более что в мицеллярной среде изменяются кислотно-основные свойства растворенных веществ [53]. При разделении ряда диуретиков изучено влияние рН, концентрации SDS и объемной доли органического модификатора (ацетонитрила) на асимметрию хроматографического пика, эффективность, селективность, разделение и время анализа [97]. Показано, что экспериментальные данные для ионогенных сорбатов могут быть описаны эмпирическим уравнением, аналогичным уравнениям (5-7) для неионогенных сорбатов:

$$\frac{1}{k'} = a_0 + a_1 [M] + a_2 \phi + a_3 pH + a_{12} [M] \phi + a_{13} [M] pH + a_{23} pH \phi + a_{33} pH^2 + a_{233} pH^2 \phi + a_{333} pH^3 \quad (33)$$

где: $a_0, a_1, a_2, a_3, a_{12}, a_{13}, a_{23}, a_{33}, a_{233}, a_{333}$ — эмпирические коэффициенты, которым не приписывают определенного физического смысла.

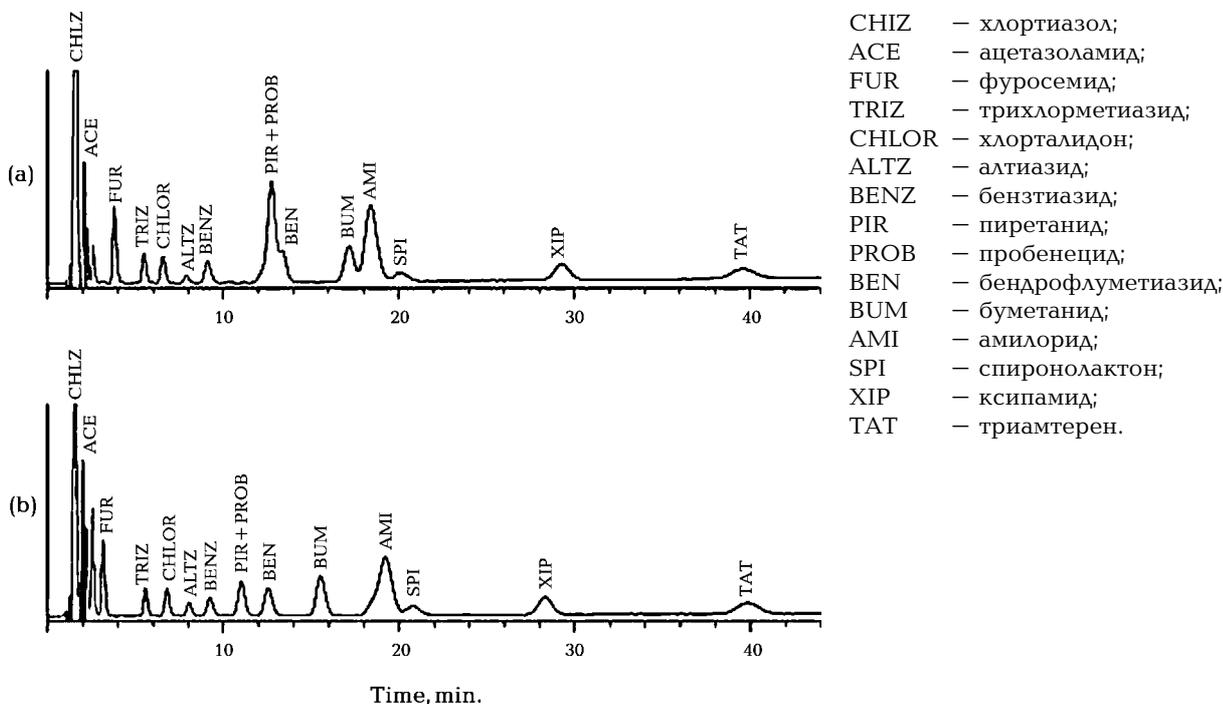
При разделении сорбатов, находящихся в катионной форме, даже небольшое изменение рН подвижной фазы может привести к кардинальному изменению селективности и других характеристик хроматографической

системы в МЖХ (Рис. 8). Это объясняется сильным электростатическим взаимодействием протонированных сорбатов с отрицательно заряженной поверхностью неподвижной фазы, модифицированной анионным SDS.

Принимая во внимание специфику МЖХ, можно сделать следующий вывод: традиционный подход к оптимизации эффективности и селективности разделения, используемый в ОФ ВЭЖХ, не будет эффективен в МЖХ. Если в ОФЖХ используют *последовательную* стратегию оптимизации (селективность обеспечивают выбором типа органического модификатора, а силу растворителя корректируют за счет его концентрации), то в МЖХ следует использовать *одновременную* оптимизацию обоих параметров путем как выбора ПАВ и модификатора, так и варьирования их концентраций. В случае ионогенных сорбатов к варьированию ПАВ и модификатора, как показано в [97], необходимо еще прибавить варьирование рН.

Одним из подходов к одновременной оптимизации состава подвижной фазы в МЖХ является метод итерационной регрессии, предложенный Страстерсом с соавторами [77]. Суть метода заключается в том, чтобы на основании минимального количества исход-

Рисунок 8



Хроматограммы, полученные с использованием мицеллярной подвижной фазы состава ацетонитрил-вода (11-89) с 0.075 М SDS и рН: (а) 5.07 и (b) 5.27

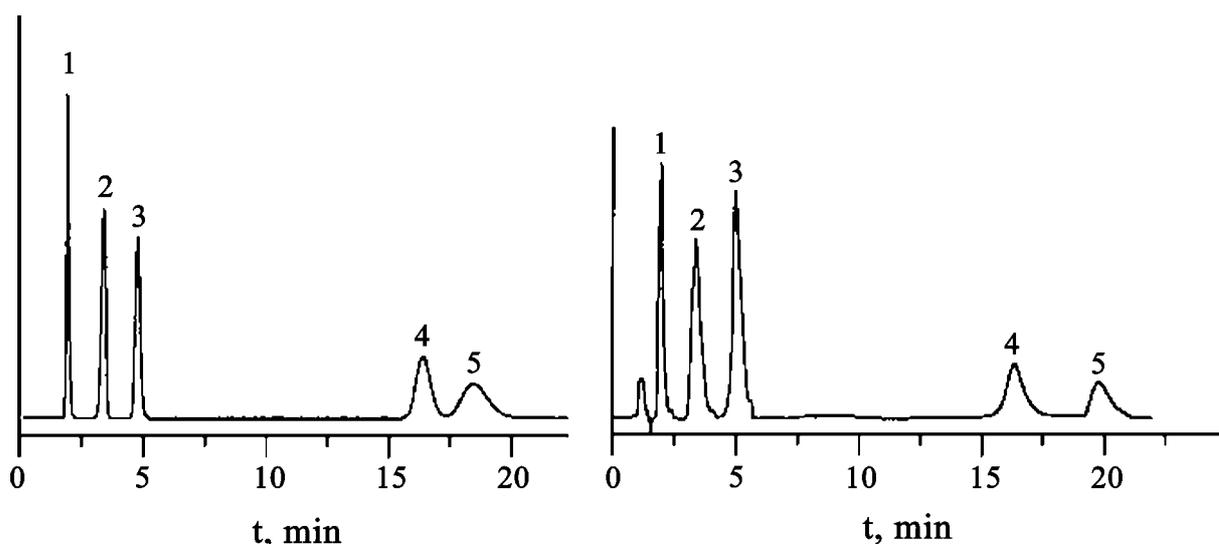
ных экспериментов (около пяти) получить эмпирические зависимости типа (5-7) от двух переменных – равновесной концентрации мицеллизованный ПАВ и объемной доли модификатора. Далее эти зависимости можно использовать для нахождения оптимального соотношения ПАВ-модификатор.

Эмпирические уравнения Страстерса и различные варианты трехфазной модели (уравнения 5-7, 13, 18-20 и их вариации [3]) используются в качестве описывающих функций в компьютерной программе «MICHROM», предназначенной для оптимизации состава мицеллярного элюента и характеристик хроматографического разделения в МЖХ. Программа является приложением к монографии Гарсии-Алварез-Кокуи и Бертода [3].

Проведя предварительный эксперимент в соответствии с планом факторного пространства, рассчитывают коэффициенты регрессии и выбирают лучшую описывающую функцию. На ее основе с использованием параметров, описывающих форму пиков, выполняют моделирование хроматограмм для заданных значений переменных. Описание пиков проводится с помощью линейно модифицированной модели гауссиана, представленной в виде:

$$h(t) = H \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(t-t_R)^2}{[s_0 + s_1(t-t_R)]^2}\right), \quad (34)$$

Рисунок 9



Хроматограмма, которая смоделирована при помощи программы «MICHROM» (слева) и реальная хроматограмма разделения витаминов группы В (справа), полученная с использованием подвижной фазы 0.1 М SDS – 4 % 1-пентанол, рН = 3 [98]

1 – рибофлавин; 2 – никотинамид; 3 – пиридоксин; 4 – пиридоксамин; 5 – тиамин.

где:

H – высота пика (связанная с площадью пика, который является параметром, изменяемым пользователем);

t_R – время удерживания;

s_0 – измеренная ширина пика в максимуме;

s_1 – фактор искажения.

Точность модели может быть улучшена добавлением большего количества членов в полином. Простейшая модель всего с двумя коэффициентами (s_0 , s_1) точно обеспечивает моделирование для асимметричных пиков с асимметрией 2.5 или даже больше.

На Рис. 9 сопоставлены хроматограммы, смоделированные при помощи программы «MICHROM» и реальная хроматограмма разделения витаминов группы В [98].

5. Аналитическое применение МЖХ

Первые статьи о применении МЖХ в аналитической химии были опубликованы практически сразу же после основополагающих работ Армстронга и Нома; к числу первых относятся опубликованные в 1984 году работы по использованию мицеллярных подвижных фаз при анализе протеинов [99] и пестицидов [100].

Наряду с использованием МЖХ в химическом анализе важнейшими направлениями исследований в МЖХ было и остается исследование механизма удерживания в хроматографических системах [3, 57, 78-80, 86] и ис-

следование взаимосвязи удерживание – строение (гидрофобность) сорбата [37-44, 57, 78-80, 86]. Появились работы, посвященные использованию МЖХ для изучения констант равновесий [16], кинетики реакций [101, 102], изучению экотоксичности химических веществ [42].

В основном МЖХ используется для анализа органических соединений [104-112], но описано также применение мицеллярных элюентов для определения неорганических анионов [8,103] и катионов [8,104], хелатов металлов [105,106], соединений мышьяка [107], селена [108], ртути [109] и других неорганических соединений. Использованию мицеллярных элюентов для определения неорганических соединений был посвящен обзор Окады [8].

В Табл. 5 приведены некоторые примеры использования МЖХ в аналитической химии для анализа различных веществ.

Одно из преимуществ МЖХ — усиление аналитического сигнала — реализуется при использовании детекторов по флуоресценции [116-118]. Усиление сигнала обусловлено двумя причинами:

1) в мицеллярных средах усиливается интенсивность флуоресценции соединений, связываемых мицеллярной псевдофазой; могут претерпевать изменения и такие параметры как длины волн возбуждения и поглощения, квантовый выход, время флуоресценции, что можно использовать в аналитических целях [3];

2) мицеллярная среда влияет на кислотно-основные свойства растворенных соедине-

ний: в присутствии анионных мицелл увеличивается сила оснований, в присутствии катионных ПАВ увеличивается сила кислот [53]. Соответствующий выбор мицеллярной среды позволяет смещать равновесие в сторону протолитической формы, обладающей более интенсивной флуоресценцией.

Усиление флуоресценции обычно измеряется фактором мицеллярного усиления, который определяется как отношение между интенсивностью флуоресценции в мицеллярном растворе к интенсивности флуоресценции в немицеллярном растворителе. Так, на Рис. 10 показано усиление флуоресценции ацикловира при концентрации SDS выше ККМ [119]. Его можно объяснить увеличением константы протонирования ацикловира в среде анионных мицелл SDS: флуоресценцией обладает протонированная форма ацикловира.

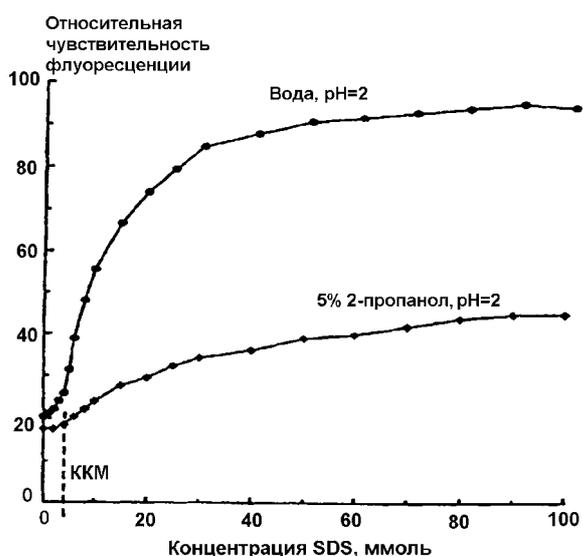
С другой стороны, добавка органического модификатора в мицеллярную подвижную фазу приводит к уменьшению флуоресценции ацикловира по сравнению с «чистым» мицеллярным раствором. Однако при использовании «чистых» мицеллярных фаз время удерживание ацикловира на силикагеле с привитыми октадецильными группами оказалось слишком большим. Поэтому для увеличения эффективности разделения и уменьшения времени анализа в состав подвижной фазы пришлось вводить изопропанол, частично жертвуя интенсивностью флуоресценции [119].

Таблица 5

Примеры использования МЖХ в химическом анализе

Вещества	Объект анализа	Условия; предел обнаружения	Литература
фугнициды – различные N-замещенные дитиокарбаматы	вода в бассейнах	μ-Bondapak CN; метанол – 0.018 М фосфатный буферный раствор pH 6.8 (30-70), содержащий 0.0125 М СТАВ; УФ-254 нм	100
ванилин, этилванилин	табак	Radialpak C18; 6 % Brij-35; УФ-280 нм	110
фенотиазины	растворы	LiChrosorb C8; 0.005 СТАВ в 0.1 М фосфатном буферном растворе pH 4.6; УФ-254 нм	111
консерванты	косметика	Hypersil C8; 0.1 М SDS – 10 % 2-пропанол – 0.3 % триэтиламин с pH 30; УФ-300 нм	112
гидразина малеат	табак	Hypersil C18; 0.004 М СТАВ в 0.04 М фосфатном буферном растворе pH 7.0; УФ-330 нм; 20 мг/г	113
гормон роста человека	ферментативный бульон	Nucleosil C4; 0.035 М SDS – 25 % 1-пропанол с pH 6.4; УФ-214 нм; 10 мкг/мл	114
фунгицид тирам	речная вода	Spherisorb ODS-2; 0.01 М СТАВ – 20 % ацетонитрил в 0.01 М фосфатном буферном растворе pH 6.2; УФ-254; 25 нг/мл	115

Рисунок 10



Изменение флуоресценции в «чистых» и гибридных мицеллярных подвижных фазах

В Табл. 6 приведены пределы детектирования в МЖХ и обращенно-фазовой хроматографии с флуоресцентным детектированием для ряда полиароматических углеводородов. Из таблицы видно, что при использовании мицеллярных подвижных фаз пределы детектирования ниже, чем в случае водно-органического элюента.

6. МЖХ в фармацевтическом анализе

Метод МЖХ находит широкое практическое применение при анализе фармацевтических препаратов.

Мицеллярные подвижные фазы во многих случаях могут заменить традиционные водно-органические подвижные фазы при контроле качества лекарственных субстанций и готовых лекарственных средств [162, 163]. Применение МЖХ позволило во многих случаях разработать методики анализа с улучшенными метрологическими характеристиками, и

ряд таких методик включен в Фармакопеи ведущих стран.

В Табл. 7 приведены лекарственные вещества, для контроля качества которых соответствующими монографиями предусмотрено использовать мицеллярные подвижные фазы.

Сейчас использование мицеллярных фаз при контроле качества лекарственных субстанций составляет примерно 5 % от общего числа монографий в Европейской Фармакопее и Фармакопее США — показатель довольно низкий. Отчасти это связано с тем, что МЖХ является достаточно новым хроматографическим методом, а Фармакопеи известны своим консерватизмом по части введения новых методов анализа.

На данном этапе развития МЖХ не остается места опасениям в том, что методики с использованием мицеллярных подвижных фаз будут обладать меньшей чувствительностью и/или плохой воспроизводимостью по сравнению с традиционной обращенно-фазовой хроматографией. В Табл. 8 сопоставлены данные по пределам детектирования для различных веществ в традиционной обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии с использованием мицеллярных элюентов.

Как видно из Табл. 8, методики с использованием МЖХ характеризуются практически такими же значениями предела детектирования, как и методики ОФ ВЭЖХ.

При использовании МЖХ в фармацевтическом анализе следует учесть, что пробоподготовку необходимо проводить с использованием мицеллярных растворов ПАВ. В [3] даны основные рекомендации по пробоподготовке лекарственных средств для дальнейшего применения МЖХ:

— **для таблеток, драже и капсул: точную навеску порошка растертых таблеток или**

Таблица 6

Сравнение пределов флуоресцентного детектирования ПАУ (нг/мл) с использованием МЖХ и ОФ ВЭЖХ

Соединение	МЖХ, 0.035 М SDS	ОФ MeOH:H ₂ O 30:70 [120]	Соединение	МЖХ, 0.024 М SDS;	ОФ MeOH:H ₂ O 40:60 [121]
аценафтилен	100	270	антрацен	0.2	0.2
1,2-бензантрацен	0.5	2,0	бенз[е]пирен	0.2	0.5
бенз[а]флуорен	270	480	бифенил	0.2	0.7
пирен	1.7	17.4	флуорантен	2.5	3.8
			нафталин	0.3	1.2
			пирен	0.25	2.6

Таблица 7

Рекомендации по использованию мицеллярных элюентов в методиках хроматографического анализа лекарственных субстанций, описанных в Фармакопеях

Вещество	Тип колонки	Подвижная фаза	Концентрация ПАВ, ммоль/л
Европейская Фармакопея, 4 издание [122]			
алкурония хлорид	C18	смесь метанола, ацетонитрила и раствора 6.82 г/л калия дигидрофосфата в соотношении 20:40:40, содержащая 2.18 г/л SDS и доведенная до pH 5.4 кислотой фосфорной	7.6
атропин	C18	смесь раствора 7.0 г/л калия дигидрофосфата, доведенного до pH 3.3 кислотой фосфорной и ацетонитрила, в соотношении 606:320 с 3.5 г/л SDS	12.2
бенфлуорекса гидрохлорид	C18	смесь равных объемов ацетонитрила и раствора 2.18 г/л калия дигидрофосфата и 6.5 г/л SDS, доведенная до pH 2.5 кислотой фосфорной	22.6
бетагистина мезилат	C18	смесь 10 % раствора кислоты серной, раствора 17.0 г/л тетрабутиламмония гидросульфата, воды и ацетонитрила в соотношении 15:35:650:300, содержащая 2.0 г/л SDS	6.9
гидразина гидрохлорид	CN	смесь ацетонитрила и раствора 1.44 г/л SDS, 0.75 г/л тетрабутиламмония гидроксида, доведенного до pH 3 раствором кислоты серной, в соотношении 22:78	3.9
гиосцина бутилбромид	C18	смесь 0.001 М раствора кислоты хлористоводородной и метанола в соотношении 37:68, содержащая 2.0 г/л SDS	6.9
даунорубицина гидрохлорид	C18	смесь равных объемов ацетонитрила и воды, содержащая 2.88 г/л SDS и 2.25 г/л кислоты фосфорной	10.0
дексипропоксифена гидрохлорид	Si	смесь 0.2 М фосфатного буферного раствора pH 7.5, тетрагидрофурана, метанола и воды в соотношении 50:84:350:516, содержащая 0.9 г/л СТАВ	2.5
дигидралазина сульфат	CN	смесь ацетонитрила и раствора 1.44 г/л SDS, 0.75 г/л тетрабутиламмония бромид, доведенного до pH 3 раствором кислоты серной, в соотношении 22:78	3.9
доксорубицина гидрохлорид	C18	смесь равных объемов ацетонитрила и раствора 2.28 г/л SDS и 2.25 г/л кислоты фосфорной	4.0
зопиклон	C18	смесь ацетонитрила с раствором 1.6 г/л натрия дигидрофосфата и 8.1 г/л SDS, доведенного до pH 3.5 кислотой фосфорной, в соотношении 38:62	17.4
никотин	C18	смесь ацетонитрила и раствора 13.6 г/л калия дигидрофосфата, доведенного до pH 4.5 раствором натрия гидроксида, в соотношении 25:75, содержащий 2.31 г/л SDS	8.0
никотина резинат	C18	смесь ацетонитрила и раствора 13.6 г/л калия дигидрофосфата, доведенного до pH 4.5 раствором натрия гидроксида, в соотношении 25:75, содержащий 2.31 г/л SDS	8.0
пепфлоксацина мезилат дигидрат	C18	смесь ацетонитрила и раствора 2.7 г/л СТАВ, 6.18 г/л кислоты борной, доведенный до pH 8.3 раствором натрия гидроксида, в соотношении 30:70, содержащий 2% (об/об) тиодигликоля	***5.2
пирензипина гидрохлорид	C18	смесь раствора 2.0 г/л SDS, доведенного до pH 3.2 кислотой уксусной, ацетонитрила и метанола в соотношении 55:15:30	3.8
пиридостигмина бромид	C18 BDS	смесь ацетонитрила и раствора 4.33 г/л SDS, доведенного до pH 2.0 кислотой фосфорной, в соотношении 30:70	10.5
Пропранолола гидрохлорид	C18	смесь ацетонитрила, воды и кислоты серной в соотношении 550:450:1, содержащая 1.6 г/л SDS и 0.31 г/л тетрабутиламмония дигидрофосфат	5.6
транексамовая кислота	C18	смесь 600 мл раствора, содержащего 11.0 г натрия дигидрофосфата, 5 мл триэтиламина, 1.4 г SDS, доведенного до pH 2.5 кислотой фосфорной, с 400 мл метанола	4.9



Таблица 7 (продолжение)

Вещество	Тип колонки	Подвижная фаза	Концентрация ПАВ, ммоль/л
хлорпросиксена гидрохлорид	C18 BDS	смесь метанола, ацетонитрила и воды в соотношении 50:400:550, содержащая 6.0 г/л калия дигидрофосфата, 2.9 г/л SDS и 9 г/л тетрабутиламмония бромида	10.1
эпирубицина гидрохлорид	триметил-силил-силикагель	смесь метанола, ацетонитрила и раствора 3.7 г/л SDS с 2.8 % (об/об) кислоты фосфорной, в соотношении 17:29:54	6.9
этилэфрина гидрохлорид	C18	смесь ацетонитрила и раствора 1.1 г/л SDS, доведенного до pH 2.3 кислотой фосфорной, в соотношении 35:65	2.5
Фармакопея США, 24 издание [123]			
ацебутолола гидрохлорид	C18	смесь метанола, 0.3 % раствора SDS, кислоты уксусной в соотношении 675:325:20	3.4
алтеплаза	полимерные смолы	водный раствор 27.6 г/л натрия дигидрофосфата и 1.0 г/л SDS, доведенный до pH 6.8 натрия гидроксидом	3.5
дибукаин	C18	раствор: 1.2 г SDS, 0.2 г натрия ацетата, 2 мл триэтиламина в 300 мл воды. Смесь метанола и раствора в соотношении 70:30	4.2
дипевифрина гидрохлорид	C18	смесь 0.014 М раствора SDS, ацетонитрила и кислоты уксусной в соотношении 15:24:1	2.1
доксорубицина гидрохлорид	триметил-силил-силикагель	смесь воды, ацетонитрила, метанола и кислоты фосфорной в соотношении 540:290:170:2, содержащая 1.0 г/л SDS, доведенная до pH 3.6 раствором натрия гидроксида	3.5
гидразина гидрохлорид	CN	раствор: 1.44 г SDS и 0.75 г тетрабутиламмония бромида в 770 мл воды. Смесь ацетонитрила и раствора в соотношении 77:23, доведенная до pH 3.0 кислотой серной	5.0
идарубицина гидрохлорид	триметил-силил-силикагель	смесь воды, ацетонитрила, метанола и кислоты фосфорной в соотношении 540:290:170:2, содержащая 1.0 г/л SDS, доведенная до pH 3.6 раствором натрия гидроксида	3.5
никотина полакрилекс	C18	раствор: 18.02 г SDS и 25 мл кислоты уксусной доводят до объема 250 мл водой. Смесь воды, 1 М раствора натрия ацетата, раствора, ацетонитрила в соотношении 640:50:40:270	10.0
пролантелина бромид	C8	раствор: 17.3 г SDS, 10 мл кислоты фосфорной, 250 мл 0.5 М раствора натрия гидроксида доводят до объема 2 л водой, доведенный до pH 3.5. Смесь ацетонитрила и раствора в соотношении 55:45	13.5
пропранолола гидрохлорид	C8	0.5 г SDS, 18 мл 0.15 М раствора кислоты фосфорной, 90 мл ацетонитрила и 90 мл метанола доводят до объема 250 мл водой	6.9

содержимого капсул помещают в мерную колбу (сосуд) и проводят процедуры растворения с использованием 0.05-0.1 М раствора ПАВ в подходящем растворителе, используя, если это возможно, ультразвуковую баню;

- **для гелей:** точная навеска геля должна быть растворена в 0.05-0.1 М растворе ПАВ;
- **для инъекционных/инфузионных средств, капель, спреев:** аликвота раствора должна быть смешана с 0.05-0.1 М раствором ПАВ;

– **для суспензий:** аликвота гомогенизированной суспензии должна быть смешана с 0.05-0.1 М раствором ПАВ или навеска порошка для приготовления суспензии растворяется в растворе, содержащем 0.05-0.1 моль/л ПАВ;

– **лекарственные средства на масляной основе:** аликвота раствора смешивается с подходящим объемом раствора ПАВ с концентрацией 0.1 моль/л для образования эмульсии, которую растворяют в растворе ПАВ при помощи встряхивания или ультразвука до получения прозрачного раствора.

Таблица 8

Сравнение пределов детектирования для веществ, определенных при помощи методов ОФ ВЭЖХ и МЖХ

Вещество	ОФ ВЭЖХ	МЖХ
[98]		
колонка; подвижная фаза	Kromasil C18; метанол-вода (60:40) рН 3.0	Kromasil C18; 0.1 М SDS – 4 % пентанол рН 3.0
никотинамид	12 нг/мл	10 нг/мл
пиридоксамин	20 нг/мл	5 нг/мл
пиридоксина гидрохлорид	12 нг/мл	12 нг/мл
рибофлавин	4 нг/мл	3 нг/мл
тиамина гидрохлорид	25 нг/мл	20 нг/мл
[36]		
Колонка; подвижная фаза	XTerra C18; ацетонитрил – 0.05 М фосфатный буферный раствор рН 3.0 (30:70)	Zorbax Eclipse XDB C8; 0.075 М SDS – 6 % пентанол – 0.05 М фосфатный буферный раствор рН 3.0
амитриптилин	0.02 мг/мл	0.54 мг/мл
кломипрамин	0.19 мг/мл	0.18 мг/мл
доксепин	0.03 мг/мл	0.24 мг/мл
мапротиллин	0.21 мг/мл	1.70 мг/мл
нортриптилин	0.22 мг/мл	0.40 мг/мл
тримипрамин	0.04 мг/мл	0.09 мг/мл
[124]		
колонка; подвижная фаза	Nucleosil 100-10 C18; ацетонитрил – 0.05 М раствор кислоты фосфорной (30:70)*	Spherisorb ODS-2; 0,05 М SDS – 1.5 % 1-пропанол – 0.05 М фосфатный буферный раствор рН 7.0
кофеин	5.2 мг/мл	6.0 мг/мл

* – по данным [125]

При необходимости полученные растворы могут быть отфильтрованы с применением тефлоновых мембранных фильтров с размером пор 0.45 мкм.

Использованию мицеллярных подвижных фаз для хроматографического контроля содержания лекарственных веществ в биологических объектах посвящены обзоры [1,6,9,126]. Эта техника открывает широкие возможности для изучения терапевтического действия лекарственного средства (адсорбция лекарственного вещества организмом [41]), его токсичности, метаболических процессов, а также для изучения стабильности препарата, кинетики деструкции. Возможно также использование МЖХ для клинической химии и судебно-медицинской экспертизы [127].

При контроле качества лекарственных веществ методом МЖХ находит широкое применение и использование дериватизационной техники (предколоночной и постколоночной дериватизации) [32,45,46]. Поскольку и дериватизационный реагент, и продукты реакции могут быть солюбилизированы ми-

целлярным раствором ПАВ, при пробоподготовке возможно исключить стадии экстракции и выпаривания, опасные как потерями образца, так и появлением дополнительных продуктов разложения. Особенно перспективна такая методология для анализа веществ, которые не поглощают в УФ-области спектра, например, аминокислот. Использование в МЖХ препаратов биологических материалов (препараты плаценты, экстракты из биологических образцов, препараты крови) создает возможности для решения новых задач, например, определения аминокислотного состава препаратов плаценты.

В последнее время появляется все больше публикаций, в которых для контроля качества лекарственных средств предложено использовать МЖХ. В Табл. 9 обобщены литературные данные, наглядно иллюстрирующие возможности МЖХ как при анализе субстанций, так и при анализе готовых лекарственных форм и биологических объектов (плазма, сыворотка крови, моча).

Таблица 9

Применение МЖХ в фармацевтическом и биофармацевтическом анализе

Вещества	Колонка; подвижная фаза; метод детектирования; предел детектирования	Литература
кислота ацетилсалициловая (I), хлорамфеникол (II), теофиллин (III), ацетаминофен (IV), карбамазепин (V), фенобарбитал (VI), фенитоин (VII), прокаинамид (VIII), хинидин (IX).	Supelcosil LC-18 (I, II), μ -Bondapak C18 (III), Supelcosil LC-CN (IV-IX); 0.02-0.10 M SDS или Brij-35, pH=3; УФ 254 нм (I-VIII), Фл 336/370 нм (IX); 0.2-3 (I-VIII), 0.3 (IX) мкг/мл	128, 129
карбамазепин (I), теофиллин (II)	Supelcosil LC-CN (I), Supelcosil LC-18 (II); 0.02 M SDS (I), 0.05 M SDS (I); УФ 254 нм	130
теофиллин	μ -Bondapak phenyl; 0.001 M C12 DAPS-3 % 1-пропанол; УФ 273 нм; 0.5 мкг/мл	131
кофеин (I) и его метаболиты, теофиллин (II), теобромин (III)	Spherisorb ODS-2; 0.075 M SDS-1.5 % 1-пропанол; УФ 273 нм; 1.2 (I), 0.4 (II, III) мкг/мл	132
ацетаминофен (парацетамол)	Nucleosil C18; 0.05 M SDS-3.0 % 1-пропанол; АМП; 0.02 мкг/мл	133
цефалоспорины: цефменоксима гемигидрохлорид и цефотама дигидрохлорид	Nucleosil C18; 0.08 M SDS-8.0 % 2-пропанол в 0.05 M фосфатном буферном растворе с pH 3.0; УФ 260 нм; 2 мкг/мл	134
цефалоспорины: цефалексим (I), цефрадион (II), цефотаксим (III), цефменоксим (IV)	Develosil ODS; 0.02 M SDS в 0.05 M фосфатном буферном растворе pH 6.1 (I, II) и 0.15 M SDS в 0.05 M фосфатном буферном растворе pH 3.1 (III, IV) при температуре 40 °C; УФ 254 нм	135
ацикловир	Seraon SGX C18; 0.02 M SDS в 0.05 M фосфатном буферном растворе pH 2.0; Фл 285/370 нм; 0.08 мкг/мл	119
сульфонамиды: сульфациетамид, сульфадиазин, сульфамеразин, сульфатиазол, сульфаметазин, сульфаметоксипиридазин, сульфаклорпиридазин, сульфоамонетоксин, сульфабензамид, сульфадиметоксин, сульфахиноксалин, сульфисомидин	Гидрофильная эндкепированная ODS при 40 °C; 0.07 M SDS-6,0% 1-пропанол; УФ 254 нм	67
сульфонамиды: сульфадиазин (I), сульфагуанидин (II), сульфаметизол (III), сульфаметоксазол (IV), сульфатиазол (V)	Spherisorb ODS-2; 0,05 M SDS-2,4% 1-пентанол, предколоночная дериватизация (получение азопроизводных); Вид 550 нм; 0.1 (I, IV), 0.2 (II, V), 0.3 (III) мкг/мл	136
буметанид	Nucleosil C18; 0.10 M SDS-3.0 % 1-пропанол в 0.05 M фосфатном буферном растворе pH 3.5; УФ 305 нм	137
гидрохлортиазид	Hypersil C18; 0.02 M Brij 35-0.004 M SDS в 0.01 M фосфатном буферном растворе pH 6.5; УФ 271 нм	138
бендрофлуметиазид, хлорталидон	Spherisorb ODS-2; 0.05 M SDS-5 % метанол при температуре 50 °C; УФ 224 нм; 0.1-0.05 мкг/мл	139
амилорид (I), бендрофлуметиазид (II), буметанид (III), хлорталидон (IV), этакриновая кислота (V), фуросемид (VI), спиролактон (VII), триамтерен (VIII), ксипамид (IX), пробенецид (X)	Spherisorb ODS-2; 0.042 M SDS-4 % 1-пропанол в 0.01 M фосфатном буферном растворе pH 4.5; УФ 254 нм; 0.8 (I, V), 0.4 (III, VI, VII), 0.3 (IV), 0.2 (VIII, X), 0.08 (IX) мкг/мл	140
алтиазид (I), бендрофлуметиазид (II), хлортиазид (III), гидрохлортиазид (IV), гидрофлуметиазид (V), трихлортиазид (VI), фуросемид (VII)	Spherisorb ODS-2; 0.05 M SDS-8 % 1-пропанол, предколоночная дериватизация (получение азопроизводных); Вид 550 нм; 2.9 (I), 2.5 (II), 2.2 (IV), 2.0 (VI), 1.7 (VII) мкг/мл	141
амилорид (I), бендрофлуметиазид (II), буметанид (III), гидрофлуметиазид (IV), пиретанид (V), триамтерен (VI)	Spherisorb ODS-2; 0.055 M SDS-8 % 1-пропанол; Фл 270/430 нм; 9.7 (I), 10 (II), 1.4 (III), 7.1 (IV), 54 (V), 1.7 (VI) нг/мл	142
ацебутолол (I), атенолол (II), целипролол (III), лабеталола (IV), метопролол (V), надолол (VI), пропранолол (VII)	Spherisorb ODS-2; 0.1 M SDS-15 % 1-пропанол-1 % триэтиламин в 0.02 M фосфатном буферном растворе pH 3; Фл 230/440 (I, III, IV), 230/300 (II, V, VI), 230/340 (VII) нм; 30 (I), 19 (II), 200 (III), 20 (IV), 16 (V), 8 (VI), 3 (VII) нг/мл	71



Таблица 9 (продолжение)

Вещества	Колонка; подвижная фаза; метод детектирования; предел детектирования	Литература
амилорид (I), бендрофлуметазид (II), пиретанид (III), триамитерен (IV), ацебутолол (V), атенолол (VI), лабеталол (VII), метопролол (VIII), надолол (IX), пропранолол (X)	Spherisorb ODS-2; 0.11 M SDS-8 % 1-пропанол; Фл 230/440 (I-V, VII), 230/440 (VI, VIII, IX, X) нм; 10.6 (I), 17.5 (II), 12.3 (III), 2.8 (IV), 27.6 (V), 3.8 (VI), 28.3 (VII), 19.2 (VIII), 12.3 (IX), 11.8 (X) нг/мл	143
кодеин (I), морфин (II), пропранолол (III), хинидин (IV), хинин (V)	μ-Bondapak C18 и Supelcosil LC-CN; 0.02-0.05 M SDS –10 % 1-пропанол; Фл 215/300 нм; 0.3 (I, II), 0.01 (III), 0.03 (IV, V) мкг/мл	144
амифеназол (I), амилорид (II), амфетамин (III), клостебол (IV), эфедрин (V), фенилпропаноламин (VI), метандиенон (VII), метоксифенамин (VIII), нандролон (IX), спиронолактон (X)	Spheri-5 RP-18; 0.2 M SDS – 3 % 1-пентанол; УФ 260 нм; 2.6 (I), 11 (II), 4.1 (III), 1.2 (IV), 4.2 (V), 2.2 (VI), 0.4 (VII), 8.7 (VIII), 0.07 (IX), 1.6 (X) мкг/мл	145
боластерон (I), кортизон (II), метилтестостерон (III), прогестерон (IV), тестостерон (V), тестостерона ацетат (VI)	C18; 0.1 M SDS – 20 % ацетонитрил-0.01 M Tb(NO ₃) ₃ ; Фл 254/547; 10 (I, IV, VI), 50 (II, III, V) нг/мл	116
гидроксикортикостерон (I), кортикостерон (II), норгистерон (III), тестостерон (IV), медроксипрогестерона ацетат (V), прогестерон (VI)	Spheri-5 RP-18; 0.05 M SDS – 9 % 1-бутанол; УФ 245 нм; 50 (I, II), 100 (III-VI) нг/мл	146
никотин (I), котинин (II)	Econospher CN; 0.2 M SDS – 3 % 2-пропанол с pH 4.6 и 40 °C; УФ 260 нм; 0.2 (I), 0.1 (II) мкг/мл	147
6-меркаптопурин (I), 6-тиогуанин (II), 6-меркаптопурин рибозид (III), 6-тиогуанин рибозид (IV), 6-тиоксантин (V)	LiChrosorb RP-18; 0.08 M SDS в 0.01 M фосфатном буферном растворе pH 3.0 при температуре 30 °C; УФ 320 нм; 0.56 (I), 0.21 (II), 0.10 (IV) мкг/мл	148
метотрексат	LiChrospher 100 RP-18; 0.08 M SDS в 0.05 M фосфатном буферном растворе pH 5.5; УФ 305 нм; 90 нМ	149
тенипозид	Chromospher C18; 0.04 M SDS – 0.5 M 1-пропанол; Амп; 500 нг/мл	150
тинидазол	Bondapak CN; 0.05 M SDS – 6 % 1-пропанол; УФ 320; 0.1 мкг/мл	151
пролин	C18; 0.03 M SDS – 8 % 1-пропанол в 0.01 M ацетатном буферном растворе pH 5.3 и 40 °C. Предколоночная дериватизация с 0.001 M Cu ²⁺ ; УФ 235; 10 мкг/мл	152
допамин	Micropak ODS; 0.01 M SDS – 3 % 1-пропанол в 0.01 M цитратном буферном растворе pH 4.15 и 0.001 M ЭДТА; Амп; 4 пг/мл	153
соединения мышьяка: диметиларсеновая кислота (I), монометиларсеновая кислота (II), As(III) (III) и As(V) (IV)	Hamilton PRP-1; 0.05 M СТАВ – 10 % 1-пропанол в 0.02 M боратном буферном растворе pH 10.2; ISP-MS; 90 (I), 300 (II-V) пг	107
алюминий	Carcell Pak MF pH-1; 0.01 M SDS – 20 % ацетонитрил. Предколоночная дериватизация с 8-хинолином; Фл 370/504; 1 нг/мл	105
медь (I), свинец (II), кадмий (III), никель (IV), кобальт (V), молибден (VI), селен (IV) (VII), ртуть (VIII), таллий (IX), хром (VI) (X)	Nucleosil 100-5 C18; метанол-ацетонитрил-вода-диизопропиловый эфир (42:20:31:7) с 1% SDS. Дериватизация с бис(этоксипропил)-дитиокарбаматом; УФ 254 нм; 100 (I), 170 (II), 200 (III-V), 500 (VI), 700 (VII), 830 (VIII), 1400 (IX), 1700 (X) нг	106
гидрокситестостерон, кетотестостерон, болденон, тестостерон, андростенолон, боластерон, эпитестостерон, кортизон, кортизол, кортикостерон, гидроксипрогестерон, деоксикортикостерон, дегидроэпиандростерон, метилтестостерон	Hypersil ODS; 0,04 M SDS – 5 % 1-пропанол при температуре 60 °C; УФ 254 нм; 10 мкг/мл	21



Таблица 9 (продолжение)

Вещества	Колонка; подвижная фаза; метод детектирования; предел детектирования	Литература
барбитал, диаллилбарбитулат, апробарбитал, бралобарбитал, фенобарбитал, гексобарбитал, бутабарбитал, бутетал, буталбитал, мефобарбитал, секобарбитал, амобарбитал, пентобарбитал	Spherisorb ODS2; 0.15 М SDS в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 3.5 или 0.02 М Brij 35 в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 7.4 или 0.05 М СТАВ в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 3.5; УФ 254 нм	154
хлорфенирамин (I), дексхлорфенирамин (II), фенилэфрин (III), фенилпропаноламин (IV), прсевдозэфедрин (V) (таблетки, капсулы)	ODS-2; 0.15 М SDS – 6 % 1-пентанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 7.0; УФ 254 нм; 16.9 (I-II), 9.1 (III), 2.8 (IV), 2.7 (V) мкг/мл	35
фуросемид и его метаболиты (таблетки, капсулы, инъекции, капли)	ODS-2; 0.04 М SDS – 2 % 1-пропанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 3.0; УФ 274 нм	2
акматин (I), кадаверин (II), гистамин (III), фенилэтиламин (IV), путресцин (V), спермидин (VI), спермин (VII), триптамин (VIII), тирамин (IX)	LiChrospher 100 RP-18; 0.4 М SDS в 0.02 М фосфатном буферном растворе pH 3.0 – ацетонитрил. Градиент от 70-30 до 50-50. Дериватизация с бензоил хлоридом; УФ 254 нм; 40 (I), 22 (II), 33 (III), 100 (IV), 15 (V), 80 (VI), 45 (VII), 55 (VIII), 50 (IX) мкг/мл	46
амитриптилин (I), кломипрамин (II), доксепин (III), мапротиллин (IV), нортриптилин (V), тримипрамин (VI)	Zorbax Eclipse XDB C8; 0.075 М SDS – 6 % 1-пентанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 3.0; УФ 254 нм; 0.54 (I), 0.18 (II), 0.24 (III), 1.7 (IV), 0.40 (V), 0.09 (VI) мкг/мл	155
железо, кадмий, цинк, медь, марганец, кобальт, никель	Inertsil ODS-2; 0.0945 М SDS в 0.0684 М тартратном буферном растворе pH 4.2; УФ 540 нм. Постколоночная дериватизация с пиридилазорезорцином	8
никотинамид (I), пиридоксамин димгидрохлорид (II), пиридоксина гидрохлорид (III), рибофлавин (IV), тиамин гидрохлорид (V) (капсулы, драже, сироп)	Kromasil C18; 0.1 М SDS – 4 % 1-пентанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 3.0; УФ 270; (I, IV, V), 290 (III), 325 (II) нм; 10 (I), 5 (II), 12 (III), 3 (IV), 20 (V) нг/мл	98
бромазепам (I), диазепам (II), флунизтазепам (III), галазепам (IV), медазепам (V), нитразепам (VI), оксазепам (VII), тетразепам (VIII)	Zorbax Eclipse XDB C8; 0.06 М SDS – 5 % 1-бутанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 7.0; УФ 230 нм; 2 (I), 3 (II), 3 (III), 5 (IV), 6 (V), 2 (VI), 2 (VII), 3 (VIII) нг/мл	156
хлортетрациклин (I), доксициклин (II), миноциклин (III), окситетрациклин (IV), тетрациклин (V) (таблетки)	Hypersil ODS; 0.05 М SDS – 5 % 1-бутанол в 0.01 М цитратном буферном растворе pH 3.0; УФ 270 нм; 0.07 (I), 0.2 (II), 0.1 (III), 0.002 (IV), 0.04 (V) мкг/мл	157
алтиазид (I), амилорид (II), бендрофлуметиазид (III), бензтиазид (IV), буметанид (V), хлорталидон (VI), этакриновая кислота (VII), фуросемид (VIII), пиретанид (IX), триамтерен (X), трихлорметиазид (XI), ксипамид (XII)	ODS-2; 0.055 М SDS – 5.6 % 1-пропанол в 0.05 М фосфатном буферном растворе pH 5.4; УФ 274 нм; 6.9 (I), 86 (II), 7.1 (III), 18 (IV), 30 (V), 49 (VI), 22 (VII), 6,5 (VIII), 61 (IX), 64 (X), 11 (XI), 18 (XII) нг/мл	29
атенолол, практолол, соталола, картеолол, надолол, пиндолол, айебутолол, целипролол, эсмолол, метопролол, тимолол, бисопролол, лабеталола, окспреналола, пропранолола, алпренолола	Spherisorb ODS-2; 0.10 М SDS – 15 % 1-пропанол; УФ 225 нм	34
карбамазепин (I), бентазепам (II), галазепам (III), оксазепам (IV), пиназепам (V), тетразепам (VI) (таблетки, капсулы)	ODS-2; 0.10 М SDS – 3 % 1-бутанол – 0.1 % триэтиламин – 0.01 М фосфатный буферный раствор pH 3.0; УФ 230 нм; 30 (I), 50 (II), 100 (III), 20 (IV), 10 (V), 30 (VI) нг/мл	158
пропилгаллат (I), третбутилгидрохинон (II), октилгаллат (III), бутилгидроксианизол (IV)	Spherisorb ODS-2; 0.10 М SDS – 2.5 % 1-пропанол – 0.01 М фосфатный буферный раствор с pH 3.0; УФ 290 нм; 0.2 (I), 0.5 (II), 1.3 (III), 1.2 (IV) нг/мл	159
кофеин	Spherisorb ODS-2; 0.05 М SDS – 1.5 % 1-пропанол – 0.01 М фосфатный буферный раствор pH 7.0; УФ 273 нм; 6.0 мкг/мл	124



Таблица 9 (продолжение)

Вещества	Колонка; подвижная фаза; метод детектирования; предел детектирования	Литература
имидазол, метилимидазол	Nucleosil 100-5 C8; метанол – 0.2 М раствора калия дигидрофосфата – вода (32.5:25:42.5), содержащая 0.005 М SDS; УФ 215 нм	160
диназол (I), канренон (II) (капсулы)	Hypersil ODS; 0.04 М SDS – 2 % 1-пентанол 60 °С; УФ-280 нм; 2.4 (I), 3.0 (II) нг/г	40
лидокаина гидрохлорид (I), толперизон (II)	C18; 0.075 М SDS – 7.5 % изопропанол; УФ-210 нм; 0.73 (I), 1.43 (II) нг/л	52
метилтестостерон (драже с сахарной оболочкой)	Hypersil ODS; 0.04 М SDS – 10 % 1-пропанол 60 °С; УФ-245 нм	161
хлоразепат (I), диазепам (II), дилтиазем (III) (капсулы, драже, суспензии)	Spherisorb ODS2; 0.1 М SDS – 3 % 1-бутанол; УФ-230 нм; 0.10 (I), 0.02 (II), 1.0 (III) мкг/мл	163
метил-, этил-, пропил-, бутилпарабены (кремы, лосьоны, шампуни)	Spherisorb ODS2; 0.1 М SDS – 2.5 % 1-пропанол в 0.01 М фосфатном буферном растворе pH 3.0; УФ-280 нм; 0.10 нг	164

Заключение

Мицеллярная жидкостная хроматография — разновидность жидкостной хроматографии со специфическими возможностями управления селективностью и эффективностью разделения полярных и неполярных соединений. МЖХ нашла широкое применение в фармацевтическом анализе и смежных областях анализа, таких как определение лекарственных соединений и других компонентов в биологических жидкостях. Существующая методология МЖХ включает модели и программы для оптимизации состава гибридной подвижной фазы и позволяет разрабатывать методики определения с улучшенными метрологическими характеристиками (повышение чувствительности и селективности, сокращение трудоемкости и длительности анализа, снижение стоимости и токсичности реагентов).

Следует надеяться, что метод МЖХ в скором времени займет свое достойное место в ряду хроматографических методов фармацевтического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khaledi M.G. // J. Chromatography A. — 1997. - Vol. 780. - P.3-40.
2. Carda-Broch S., Esteve-Romero J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2000. - Vol. 23. - P. 803-817.
3. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque C. Micellar Liquid Chromatography. - Dekker, 2000. - 632 p.
4. Басова Е.М., Иванов В.М., Шпигун О.А. Мицеллярная жидкостная хроматография // Успехи химии. — 1999. — Т. 68, № 12. — С. 1083-1101.
5. Dorsey J.G.// Adv. Chromatogr. — 1987. - Vol. 7. — P. 167-182.
6. Koenigbauer M.J. // J. Chromatogr. — 1990. - Vol. 531. — P. 79-99.
7. Jaminez O., Marina M.L. // J. Chromatogr. — 1997. - Vol. 780. — P. 149-163.

8. Tetsuo Okada // J.Chromatogr. A. — 1997. - Vol. 780. — P.343-360.
9. Garcia-Alvarez-Coque M.C., Carda-Broch S. // J.Chromatogr. B. — 1999. - Vol.736. — P. 1-18.
10. Berthod A., Girard I., Gonnet C.// Anal. Chem. - 1986. - Vol. 58. — P. 1356-1361.
11. Berthod A., Girard I., Gonnet C.// Anal. Chem. — 1986. - Vol. 58 — P. 1362-1368.
12. Berthod A., Roussel A.//J.Chromatogr. — 1988. - Vol. 449. — P. 349-355.
13. Montgomery M.E., Wirth M.J. // Anal. Chem. — 1992. - Vol. 64. — P. 2566-2570.
14. Borgerding M.F., Hinze W.L., Stafford L.D., Flup G.W., Hamlin W.C. // Anal. Chem. — 1989. - Vol. 61. — P. 1353-1358.
15. Lavin B.L., Hendayana S., He Y., Cooper W.T. // J.Colloid Interface Sci. — 1996. - Vol. 179. — P. 341-347.
16. Hu W., Haddad P.R. // Anal. Comm. — 1998. - Vol. 35. — P. 191-194.
17. Bailey R., Cassidy R.M. // Anal. Chem. — 1992. - Vol. 64. — P. 2277-2282.
18. Bakker M.G., Morris T.A., Turner G.L., Grander E. // J. Chromatogr. A. — 2000. - Vol. 743. — P. 65-78.
19. Montgomery M.E., Wirth M.J.// Anal. Chem. — 1994. - Vol. 66. — P. 680-687.
20. Detroyer A., Vander Heyden Y., Cambre I., Massart D.L. // J.Chromatogr. A. — 2003. - Vol. 986. — P. 227— 238.
21. Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R. // J. Chromatogr. B. - 2003. - Vol. 794. — P. 215— 225.
22. Абрамзон А.А., Бочаров В.В., Гаевой Г.М. и др. Поверхностно-активные вещества. Справочник. - Л.: Химия, 1979. — 376 с.
23. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / Под ред. К. Миттела. - М.: Мир, 1980. — 597 с.
24. Mukerjee P., Mysels K.J. // J. Amer. Chem. Soc. - 1955. - Vol.77. - P.2937-2943.
25. Bossev D.P., Matsumoto M., Nakahara M. // J. Phys. Chem. B. - 1999. - Vol.103, No.39. - P. 8251-8258.
26. Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice. — Berlin: Springer-Verlag, 1993.
27. Garcia M.A., Vitha M.F., Sandquist J., Mulville K., Marina M.L. // J.Chromatogr. A. - 2001. - Vol. 918. — P. 1— 11.
28. Detroyer A., Vander Heyden Y., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Massart D.L. // J.Chromatogr. A. - 2001. - Vol. 912. — P. 211— 221.
29. Carda-Broch S., Torres-Lapasio J.R., Esteve-Romero J.S., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // J. Chromatog. A. - 2000. - Vol. 893. — P. 321— 337.

30. Lopez-Grao S., Garcia-Alvarez-Coque M. C., Hinze W. L., Quina F. H., Berthod A. // *Anal. Chem.* - 2000. - Vol. 72. - P. 4826-4835.
31. Gil-Agusti M., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Esteve-Romero J. // *Anal. Chim. Acta.* - 2000. - Vol. 421. - P. 45-55.
32. Lopez-Grao S., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Anal. Chim. Acta.* - 2000. - Vol. 418. - P. 153 - 165.
33. Русанов А.И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. - СПб: Химия, 1992. - 279 с.
34. Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Torres-Lapasio J.R., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Anal. Chim. Acta.* - 2002. - Vol. 454. - P. 109 - 123.
35. Gil-Agusti M., Monferrer-Pons L., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Esteve-Romero J. // *Talanta.* - 2001. - Vol. 54. - 621 - 630.
36. Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *J.Pharm.Biomed. Anal.* - 2003. - Vol. 32. - P. 71-84.
37. Capella-Peiro M.E., Bose D., Martinavarro-Doménguez A., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. // *J.Chromatogr. B.* - 2002. - Vol. 780. - P. 241 - 249.
38. Izquierdo-Hornillos R., Gonzalo-Lumbreras R. // *J.Chromatogr. B.* - 2003. - Vol. 798. - P. 69 - 77.
39. Шинода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т. Коллоидные поверхностно-активные вещества. - М.: Мир, 1966. - 320 с.
40. Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R. // *J.Pharm.Biomed.Anal.* - 2003. - Vol.32. - P. 433-439.
41. Molero-Monfort M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camanas R.M., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J. // *J.Chromatogr. B.* - 2001. - Vol. 753. - P. 225 - 236.
42. Escuder-Gilabert L., Martin-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. // *Anal.Chim.Acta.* - 2001. - Vol. 448. - P. 173 - 185.
43. Qing C. Meng, Jonas S. Johansson, Roderic G. Eckenhoff // *J.Chromatogr. B.* - 2002. - Vol. 774. - P. 89 - 95.
44. Molero-Monfort M., Martén-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. // *J.Chromatogr. A.* - 2000. - Vol. 870. - P. 1 - 11.
45. Guillaume Y.C., Peyrin E., Ravel A., Villet A., Grosset C., Millet J. // *Talanta.* - 2000. - Vol. 52. - P. 233 - 240.
46. Paleologos E.K., Chytiri S.D., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. // *J.Chromatogr.A.* - 2003. - Vol. 1010. - P. 217 - 224.
47. Lopez-Grao S., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Chromatographia* 1998. - Vol. 48. - P. 655-663.
48. Rodriguez-Delargo M.A., Sanchez M.J., Gonzalez V., Garcia-Montelongo F. // *Anal. Chim. Acta.* - 1994. - Vol. 298. - P. 423-430.
49. Kulikov A.U., Loginova L.P., Samokhina L.V. // *Chromatographia.* - 2003. - Vol. 57. - P. 463-469.
50. Lopez-Grao S., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Anal. Chim. Acta.* - 1999. - Vol. 381. - P. 275-285.
51. Kayali M.N., Rubio Barosso S., Polo Diez L. // *J.Liq.Chromatogr.* - 1994. - Vol. 17. - P. 3623-3630.
52. Youngvises N., Liawruangrath B., Liawruangrath S. // *J.Pharm.Biomed.Anal.* - 2003. - Vol. 31. - P. 629-638.
53. Мчедлов-Петросян Н.О. Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах // *Вестник Харьковского нац. ун-та.* - 2002. - № 573. - Сер. хим. - Выпуск 9 (32). - С. 224-357.
54. Loginova L.P., Samokhina L.V., Mchedlov-Petrossyan N.O., Alekseeva V.I., Savvina L.P. // *Coll. Surfaces A.* - 2001. - Vol.193. - P. 207-219.
55. Мчедлов-Петросян Н.О., Пличко А.В., Шумахер А.С. Кислотность в ультрамикрорегетерогенных системах: влияние неионных добавок на кислотно-основные равновесия красителей, связанных мицеллами неионогенных ПАВ // *Хим. физика.* - 1996. - Т. 15, №11. - С. 105-120.
56. Hartland G.V., Grieser F., White L.R. Surface Potential Measurements in Pentanol-Sodium Dodecyl Sulphate Micelles // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.1.* - 1987. - Vol.83, No.3. - P. 591-613.
57. Benito I, Garcia M.A., Monge C., Saz J.M., Marina M.L. // *Coll. Surf. A.* - 1997. - Vol. 125, No.2-3. - P. 221-224.
58. Chen Z., Lin J.-M., Uchiyama K., Hobo T. // *Anal. Chem. Acta.* - 2000. - Vol. 403. - P.173-178.
59. Thimons K.L., Brazdil L.C., Harrison D., Fisch M.R. // *J. Phys. Chem.* - 1997. - Vol.101, No.51. - P. 11087-11091.
60. Rodriguez-Delgado M.A., Sanchez M.J., Gonzalez V., Garcia-Montelongo F. // *Chromatographia.* - 1994. - Vol.38, No.5/6. - P. 342-348.
61. Бондарь Н.И., Самохина Л.В., Ефимов П.В. // Тези доп. Четвертої Всеукр. конф. студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії». - Київ, 2003. - С. 140-141.
62. Бельский В.Е. Кондуктометрическое определение характеристик мицеллообразования додецилсульфата натрия в присутствии спиртов // *Изв. РАН. Сер. хим.* - 1999. - № 5. - С. 873-878.
63. Bockstahl F., Duplatre G. // *J. Phys. Chem. B.* - 2001. - Vol. 105, No. 1. - P.13-18.
64. Forland G.M., Samseth J., Gjerde M.I., Hoiland H., Jensen A.O., Mortensen K. // *Coll. Interf. Sci.* - 1998. - Vol.203. - P. 328-334.
65. Caponetti E., Chillura Martino D., Floriano M.A., Triolo R. // *Langmuir.* - 1997. - Vol.13. - P. 3277-3283.
66. Ruiz-Angel M.J., Caballero R.D., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *J.Chromatogr. A.* - 2002. - Vol. 947. - P. 31-45.
67. Yang S., Khaledi M.G. // *J.Chromatogr. A.* - 1995. - Vol. 692. - P. 311-320.
68. Noguera-Orti J.F., Villanueva-Camanas R.M., Ramis-Ramos G. // *Anal. Chim. Acta.* - 1999. - Vol.402. - P.81-86.
69. Sanchis-Mallols J.M., Villanueva-Camanas R.M., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J. // *Chromatographia.* - 1997. - Vol. 46, No. 11/12. - P.605-612.
70. Lopez-Grao S., Vivo-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Analytica Chimica Acta.* - 2001. - Vol. 433. - P. 187 - 198.
71. Rapido Martinez I., Villanueva Camanas R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Anal.Chem.*, 1999. - Vol. 71. - P. 319-326.
72. Gil-Agusti M., J.R. Torres-Lapasio, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, Esteve-Romero J. // *J.Cromatography A.* - 2000. - Vol. 866. - P. 35-49.
73. Capella-Peiro M.-E., Gil-Agusti M., Monferrer-Pons L., Esteve-Romero J. // *Anal. Chim. Acta.* - 2002. - Vol.454. - P. 125-135.
74. Рухадзе М.Д., Себикверадзе М.В., Окуджава В.М., Ткешелиадзе Н.Б. Влияние органических модификаторов на хроматографические характеристики некоторых барбитуратов в мицеллярной жидкостной хроматографии с применением додецилсульфата натрия // *Журн. физ. химии.* - 1998. - Т. 72, № 1. - С. 111-114.
75. Khaledi M.G., Peuler E., Ngeh-Ngwainbi J. // *Anal. Chem.* - 1987. - Vol. 59. - P. 2378-2388.
76. Tomasella F.P., Fett J., Clin Love L.J. // *Anal. Chem.* 1991. - Vol. 63. - P. 474-480.
77. Strasters J.K., Breyer E.D., Rodgers A.H., Khaledi M.G. // *J. Chromatogr.* - 1990. - Vol. 511. - P.17.
78. Torres-Lapasio J.R., Medina-Hernandez M.J., Villanueva-Camanas R.M., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *Chromatographia.* - 1995. - Vol. 40. - P. 279-286.
79. Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Roses M., Bosch E. // *J.Chromatogr. A.* - 2002. - Vol. 955. - P. 19-34.

80. Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *J. Chromatography A*. - 1997. - Vol. 769, No. 2. - P. 155-168.
81. Armstrong D.W., Stine G.Y. // *Anal. Chem.* - 1983. - Vol. 55. - P. 2317-2324.
82. Armstrong D.W., Nome F. // *Anal. Chem.* - 1981. - Vol. 53. - P. 1662-1675.
83. Jandera P., Fischer J. // *J. Chromatogr. A*. - 1996. - Vol. 728. - P. 279-285.
84. Arunynart M., Cline-Love L.J. // *Anal. Chem.* - 1984. - Vol. 56. - P. 1557-1563.
85. Foley J.P. // *Anal. Chem. Acta.* - 1990. - Vol. 231. - P. 237-251.
86. Garcia-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. // *J. Chromatogr.* - 1997. - Vol. 780. - P. 129.
87. Garcia-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. // *Anal. Chim. Acta.* - 1996. - Vol. 324. - P. 163-173.
88. Ambrosone L., Ragone R. // *J. Coll. Int. Sci.* - 1998. - Vol. 205. - P. 454-458.
89. Orfi L., Lin M., Larive C.K. // *Anal. Chem.* - 1998. - Vol. 70, No. 7. - P. 1339-1345.
90. Turner D., Gracie K., Taylor T., Palepu R. // *J. Colloid and Interface Sci.* - 1998. - Vol. 202, No. 2. - P. 359-368.
91. Логинова Л.П., Самохина Л.В., Куликов А.Ю. Характеристики мицеллообразования как параметры модели удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии // *Вестник Харьковского нац. ун-та.* - 2002. - № 573. - Сер. хим. - Вып. 9 (32). - С. 107-114.
92. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. 390 с
93. Lavine B.K., Cooper W.T., He Y. // *J. Colloid Interface Sci.* - 1994. - Vol. 165. - P. 497-508.
94. Lavine B.K., Hendayana S. // *J. Liq. Chromatogr.* - 1996. - Vol. 19. - P. 101-111.
95. Yarmchuk P., Weinberger R., Clin-Love L.G. // *J. Chromatogr.* - 1984. - Vol. 283. - P. 47-55.
96. Khaledi M.G. // *Anal. Chem.* 1988. - Vol. 60. - P. 876-890.
97. Ruiz-Angel M.J., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *J. Chromatogr. A*. - 2004. - Vol. 1022. - P. 51-65.
98. Monferrer-Pons L., Capella-Peiro M.E., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. // *J. Chromatogr. A*. - 2003. - Vol. 984. - P. 223-231.
99. Barford R.A., Sliwinski B.D. // *Anal. Chem.* - 1984. - Vol. 56. - P. 1554-1559.
100. Kirkbright G.F., Mullins F.G.P. // *Analyst.* - 1984. - Vol. 109. - P. 493-500.
101. Esteve-Romero J.S., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Ramis-Ramos G. // *Anal. Chem.* - 1998. - Vol. 14. - P. 29-35.
102. Guillaume Y.C., Peyrin E., Ravel A., Villet A., Grosset C., Millet J. // *Talanta.* - 2000. - Vol. 52. - P. 233-240.
103. Tetsuo Okada // *Anal. Chem.* - 1992. - Vol. 64. - P. 589-596.
104. Okada T., Shimizu H. // *J. Chromatogr. A*. - 1995. - Vol. 706. - P. 37-46.
105. Sato M., Yoshimura H., Obi H., Hatakeyama S., Kaneko E., Hoshino H., Yotsuyanagi T. // *Chem. Lett.* - 1996. - P. 203.
106. Munder A. // *Z. Anal. Chem.* - 1986. - Vol. 323. - P. 869-874.
107. Ding H., Wang J., Dorsey J.G., Caruso J.A. // *J. Chromatogr. A*. - 1995. - Vol. 694. - P. 425-230.
108. Anderwood A.L. // *Anal. Chim. Acta.* - 1992. - Vol. 140. - P. 89-98.
109. Angerwood A.L. // *Anal. Chim. Acta.* - 1982. - Vol. 140. - P. 99-105.
110. Borgerding M.F., Hize W.L. // *Anal. Chem.* - 1985. - Vol. 57. - P. 2183-2190.
111. Jira T., Raether G. // *Pharmazie.* - 1991. - Vol. 46. - P. 849-856.
112. Tomasella F.P., Zuting P., Clin-Love L.J. // *J. Chromatogr.* - 1991. - Vol. 587. - P. 325-332.
113. Yang S.S. // *J. Chromatogr.* - 1992. - Vol. 595. - P. 346-350.
114. Stege M.A., Lagu A.L. // *J. Chromatogr. A*. - 1995. - Vol. 705. - P. 155-160.
115. Lopez-Garcia A., Blanco-Gonzalez E., Sanz-Medel A. // *Chromatographia.* - 1996. - Vol. 43. - P. 607-611.
116. Amin M., Harrington K., Wadruska R. // *Anal. Chem.* - 1993. - Vol. 65. - P. 2346-2350.
117. Perez-Martinez I., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* - 1996. - Vol. 19. - P. 1957-1962.
118. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Martin J. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2003. - Vol. 32. - P. 225-231.
119. Maska M., Borak J., Semenkova L., Popl M., Mikes V. // *J. Liq. Chromatogr.* - 1993. - Vol. 16. - P. 2359-2386.
120. Weinberger R., Yarmchuk P., Clin-Love L.J. // *Anal. Chem.* - 1993. - Vol. 65. - P. 2346-2352.
121. Armsrong D.W., Hinze W.L., Bui K.H., Singh H.M. // *Anal. Lett.* - 1981. - Vol. 14. - P. 1659.
122. European Pharmacopoeia, 3rd ed. - 1997 (Supplement 4.7). - 2003.
123. United States Pharmacopoeia, 24th ed. - The United States Pharmacopoeial Convention Inc, Rockville MD, 2000. - 2570 p.
124. Perez-Martinez I., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J. // *Chromatographia.* - 1996. - Vol. 43. - P. 149-152.
125. Rehm K.D., Steinigen M. // *Pharmaz. Ztg.* - 1981. - Vol. 126. - P. 99-104.
126. Westerlund D. // *Chromatographia.* - 1987. - Vol. 24. - P. 155-165.
127. Berthod A., Asensio J.M., Laserna J.J. // *J. Liq. Chromatogr.* - 1989. - Vol. 12. - P. 2621-2630.
128. De Luccia F.J., Arununart M., Clin Love L.J. // *Anal. Chem.* - 1985. - Vol. 57. - P. 1564-1568.
129. Clin Love L.J., Zibas S., Noroski J., Arununart M. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 1985. - Vol. 3. - P. 511-521.
130. De Luccia F.J., Arununart M., Yarmchuk P., Weinberger R., Clin Love L.J. // *LC Mag.* - 1985. - Vol. 3. - P. 794-800.
131. Habel D., Guermouche S., Guermouche M.H. // *Analyst.* - 1993. - Vol. 118. - P. 1511-1513.
132. Perez Martinez I., Sagrado S., Medina Hernandez M.J. // *Anal. Chim. Acta.* - 1995. - Vol. 304. - P. 195-201.
133. Peng W.F., Li T., Li H.M., Wang E.K. // *Anal. Chim. Acta.* - 1994. - Vol. 298. - P. 514-421.
134. Haginaka J., Wakai J., Yasuda H., Nakagawa T. // *Anal. Chem.* - 1987. - Vol. 59. - P. 2732-2734.
135. Haginaka J., Wakai J., Yasuda H. // *J. Chromatogr.* - 1989. - Vol. 80. - P. 341-348.
136. Simo Alfonso E.F., Ramis Ramos G., Garcia Alvarez-Coque M.C., Esteve Romero J.S. // *J. Chromatogr. B*. - 1995. - Vol. 670. - P. 183-187.
137. Sentell K.B., Clos J.F., Dorsey J.D. // *BioChromatography.* - 1989. - Vol. 4. - P. 35-40.
138. Clin Love L.J., Fett J.J. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 1991. - Vol. 9. - P. 323-333.
139. Bonet Domingo E., Torres Lapasio J.R., Medina Hernandez M.J., Garcia Alvarez-Coque M.C. // *J. Chromatogr.* - 1992. - Vol. 582. - P. 189-194.
140. Bonet Domingo E., Torres Lapasio J.R., Medina Hernandez M.J., Garcia Alvarez-Coque M.C. // *Anal. Chim. Acta.* - 1994. - Vol. 287. - P. 201-210.
141. Carda Broch S., Garcia Alvarez-Coque M.C., Simo Alfonso E.F., Esteve Romero J.S. // *Anal. Chim. Acta.* - 1997. - Vol. 353. - P. 215-226.

142. Carda Broch S., Esteve Romero J.S., Garcia Alvarez-Coque M.C. // *Anal. Chim. Acta.* - 1998. - Vol. 375. - P. 143-154.
143. Carda Broch S., Rapado Martinez I., Esteve Romero J.S., Garcia Alvarez-Coque M.C. // *J.Chromatogr. Sci.* - 1999. - Vol. 37. - P. 93-102.
144. Arunynart M., Clin Love L.J. // *J.Chromatogr.* - 1985. - Vol. 342. - P. 293-301.
145. Carretero I., Maldonado M., Laserna J.J., Bonet E., Ramis Ramos G. // *Anal. Chim. Acta.* - 1992. - Vol. 259. - P. 203-210.
146. Chen Z.L., Wang S.F. // *Anal. Lett.* - 1997. - Vol. 30. - P. 2315-2325.
147. Reynolds J., Albazi S.J. // *J. Liq. Chromatogr.* - 1995. - Vol. 18. - P. 537-552.
148. Menendez Fraga P., Blanco Gonzalez E., Sanz Medel A. // *Anal. Chim. Acta.* - 1988. - Vol. 212. - P. 181-190.
149. Palmisano F., Guerrieri P., Zambonin P.G., Cataldi T.R.I. // *Anal. Chem.* - 1989. - Vol. 61. - P. 946-950.
150. van der Horst F.A.L., van Opstal M.A.J., Teeuwse J., Post M.H., Holthuis J.J.M., Brinkman U.A.Th. // *J. Chromatogr.* - 1991. - Vol. 567. - P. 161-174.
151. Habel D., Guermouche S., Guermouche M.H. // *Biomed. Chromatogr.* - 1997. - Vol. 11. - P. 16-18.
152. Atamna I.Z., Muschik G.M., Isaaq H.J. // *J.Liq. Chromatogr.* - 1989. - Vol. 12. - P. 1085-1094.
153. Qu Y., Hu P., Zhu P.L. // *J.Liq. Chromatogr.* - 1991. - Vol. 14. - P. 2755-2768.
154. Cuenca-Benito M., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. // *J. Chromatogr. A.* - 1998. - Vol. 814. - P. 121-132.
155. Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2003. - Vol. 32. - P. 71-84.
156. Capella-Peiro M. E., Bose D., Martinavarro-Dominguez A., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. // *J. Chromatogr. B.* - 2003. - Vol. 780. - P. 241-249.
157. Caballero R.D., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Ramis-Ramos G. // *Anal. Lett.* - 2003. - Vol. 35. - P. 687-705.
158. Gil-Agusti M., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Esteve-Romero J. // *J.Liq.Chromatogr. Relat. Technol.* - 2000. - Vol. 23. - P. 1387-1401.
159. Noguera-Orti J.F., Villanueva-Camanas R.M., Ramos-Ramos G. // *Anal. Chim. Acta* 1999. - Vol. 402. - P. 81-86.
160. Thomsen M. // *J. Chromatogr.* - 1981. - Vol. 211. - P. 213-221.
161. Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R. // *J.Pharm.Biomed.Anal.* - 2003. - Vol. 31. - P. 201-208.
162. Cholbi-Cholbi M.F., Martinez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. // *J.Liq.Chromatogr.Relat. Technol.* - 2004. - Vol. 27. - P. 153-170.
163. Gil-Agusti M., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Esteve-Romero J. // *J.Chromatogr. Sci.* - 2000. - Vol. 38. - P. 521-527.
164. Noguera-Orti J.F., Villanueva-Camanas R.M., Ramos-Ramos G. // *J.Chromatogr. Sci.* - 1999. - Vol. 37. - P. 83-87.

Резюме

Куліков А.Ю., Логінова Л.П., Самохіна Л.В.

Міцелярна рідинна хроматографія у фармацевтичному аналізі та інших областях аналізу (огляд)

Розглянуто недавно виниклий різновид рідинної хроматографії - міцелярну рідинну хроматографію (МРХ), новий вид хроматографії для фармацевтичного аналізу. Обговорені принципові особливості МРХ, її переваги та недоліки порівняно з обернено-фазовим та іон-парним варіантами рідинної хроматографії. Розглянуто вплив різних факторів на ефективність і селективність розділення, підходи до оптимізації у МРХ. Наведено емпіричні та фізико-хімічні моделі утримування у МРХ. Наведено приклади застосування МРХ у фармацевтичному, біофармацевтичному та деяких суміжних областях аналізу.

Summary

Kulikov A.U., Loginova L.P., Samokhina L.V.

Micellar liquid chromatography in pharmaceutical analysis and other analytical areas (review)

In the review of the recently originated variety of liquid chromatography - micellar liquid chromatography (MLC), a new chromatography version for the pharmaceutical analysis, is considered. The fundamental features of MLC, its advantages and defaults in comparison with reversed-phase and ion - paired chromatographies are discussed. An influence of various factors on efficiency and selectivity, approaches to MLC optimization were considered. The empirical and physico-chemical retention models in MLC were considered. The examples of MLC applications in pharmaceutical, biopharmaceutical and other related areas of analysis are given.

Куликов Артем Юрьевич (р. 1970). Окончил Харьковский государственный университет (1993). К.х.н. (1996). Ст. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ.

Логінова Лідія Павлівна. Окончила Харьковский государственный университет (1967). Д.х.н. (2001). Профессор (2003). Зав. кафедрой химической метрологии Харьковского национально-го университета им. В.Н. Каразина.

Самохіна Лариса Вячеславівна Окончила Харьковский государственный университет (1998). Науч. сотр. кафедры химической метрологии ХНУ.

УДК 582.736.3

Аммосов А.С., Литвиненко В.И.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Солодка: технология препаратов (краткий обзор)

Обобщены сведения по основным технологическим разработкам, представленным в доступной патентной и периодической научной литературе за последние десятилетия и отражающим методы комплексной переработки солодки, получения из нее очищенных субстанций, используемых для создания медицинских препаратов и других продуктов.

Солодковый корень (солодка, лакрица) — природное растительное лекарственное и техническое сырье. На территории стран СНГ солодковый (сладкий) корень применяется издавна, и сведения о нем приводятся во многих известных травниках [1, 2]. Солодка описана в Фармакопеех СССР и зарубежных Фармакопеех [3, 4].

По природным запасам и заготовкам солодкового корня бывший Советский Союз занимал ведущее место в мире [3, 5].

Растения рода солодка издавна привлекали внимание как источник природного сырья для получения ценных лекарственных, пищевых, парфюмерно-косметических, технических и других продуктов.

В настоящее время из множества обнаруженных групп биологически активных соединений (БАС) солодки (сапонины, фенольные соединения, аминокислоты, углеводы, пектины, смолы, микроэлементы и др.) непосредственное применение находят или суммарные экстракты, или только несколько основных групп БАС. Из тритерпеновых соединений — глицирризиновая кислота (ГК) и ее производные, ее агликон - глицерритиновая (глицирретовая) кислота (Гк) и ее производные; из фенольных соединений — флавоноиды; из углеводов — полисахариды [6-10].

Работу по изучению солодки в СССР координировала общенациональная программа «Солодка» (теперь «Российская солодка» в РФ), в 1991 году был проведен последний, 4-й Всесоюзный симпозиум по этой проблеме [17].

За рубежом основные исследования в этой области проводятся в Японии, США, Германии, Китае, Индии и ряде других стран.

Цель настоящего сообщения - критическое обобщение обширного литературного материала по технологии получения препаратов и субстанций из солодки.

При сборе и анализе источников патентной литературы по применению солодки нами выявлено свыше 700 источников ин-

формации за последние 50 лет. Эта информация была частично опубликована [10], кроме того, известно множество публикаций в периодической научной печати.

Всё это позволяет составить довольно полную картину изысканий не только в области изучения, создания и применения различных препаратов, продуктов из солодки, средств на ее основе и применения её в составе различных комбинаций, но и, в первую очередь, в области технологий получения из нее субстанций и отдельных индивидуальных соединений, которые в дальнейшем становятся компонентами оригинальных лекарственных препаратов и ценных комбинированных продуктов.

Имеющийся в нашем распоряжении обширный материал необходимо было дифференцировать, учитывая как последовательность его краткого изложения, так и химическую классификацию выделяемых из растительного сырья компонентов БАС и технологических методов их получения. Поэтому изложение материала представлено несколькими разделами, раскрывающими поставленную задачу. Основной упор при выполнении поставленной задачи сделан прежде всего на анализ патентной литературы, так как в ней отражены оригинальность и новизна предлагаемых технологических разработок, анализ дополнен также сведениями из других публикаций.

1. Получение извлечений из сырья солодки

Получение извлечений из растительного сырья (солодки) в патентной литературе представлено разнообразными методами, которые можно систематизировать по основным параметрам: вид экстрагента (экстрагентов), температура экстрагирования, дальнейшая обработка извлечения, форма конечного продукта и некоторые другие.

Следует отметить, что самым распространенным экстрагентом является вода с добав-

лением некоторых реагентов, затем спирт этиловый и некоторые другие растворители.

1. Обработка подготовленного сырья горячей водой (29)* или водой с добавлением небольшого количества аммиака (щелочи) (8), водорода пероксида (1), физиологическим раствором (1), минеральной водой (2), кислотой уксусной (2).

2. Обработка растительного сырья спиртом различной концентрации (18).

3. Первичная обработка растительного сырья другими растворителями: ацетоном (кетон) (5), хлороформом (3), метанолом (2), хлористым метиленом (2), различными эфирами (2), этилацетатом (1), диоксаном (1), гексаном (1), диоксидами азота, углерода, фторуглерода (1), растительным маслом (2).

Полученные извлечения сгущают с целью полного или частичного удаления экстрагента и для дальнейшей обработки (в зависимости от поставленной цели) подвергают или сушке (распылением, лиофильной), или очистке путем осаждения различными реагентами, или пропускают через различные сорбенты (оксиды металлов или органические смолы) с последующим получением целевых продуктов. Общее число источников (81).

2. Получение глицирризиновой кислоты и препаратов из нее

Известны способы выделения глицирризина (глицирризиновой кислоты) из растительного материала различными методами:

1. Обработка растительного сырья подщелоченной водой, в качестве щелочного агента используют раствор аммиака (4), раствор натрия гидроксида (4) при нагревании до температуры 100 °С. Затем извлечения подкисляют крепкими растворами минеральных кислот (серной, азотной) для получения «сырой» глицирризиновой кислоты (ГК) и далее, в зависимости от цели, ведут выделение или чистой ГК, или ее солей (натриевой, калиевой, чаще аммониевой, так называемого глицирама). Очистку солей производят методом переосаждения из смеси растворителей или на различных сорбентах (синтетические смолы (2), иониты (2), полиамид (2)).

2. Обработка растительного материала водой или подщелоченной водой, затем извлечения сразу пропускаются через сорбенты: полиамиды (2), различные синтетические смолы: амберлит, дайон, полиакрилаты (5), иониты (2).

3. Известны разнообразные методы получения глицирама — отечественной моноаммонийной соли ГК (7), очистку его на последних стадиях получения проводят на ионитах или переосаждением из различных реагентов (спирт, кислота уксусная ледяная и др.).

4. Первичная обработка растительного сырья: ацетоном (5), метанолом (2), трис-буферным раствором (1) с последующей многостадийной очисткой выделяемых конечных продуктов.

За последние годы XX века в бывшем СССР получены многочисленные (несколько десятков) производные глицирризиновой кислоты с различными классами химических БАС, имеющие ценные фармакологические свойства. Получаемые производные ГК можно разделить на ряд вполне определенно направленных по назначению новых пролекарств.

В этих работах использованы традиционные химические методы получения: солеобразование, конденсация, ионизация, комплексообразование и др., в зависимости от структуры (класса) присоединяемых к ГК (Гк) химических компонентов.

1. Соли ГК — моносодиевая соль (1), монокалий-дилитиевая соль (1), пента-О-никотинат (ниглизин) (1), трис(диизопропокси)-алюминиевая соль (1).

2. Амиды — амид пентаацетил ГК с октадециламином (1), амид фенолбороновой кислоты с ГК, триамиды пентаацетил ГК (1), пентаацетил ГК с N-холин-6-иламидом (1).

3. Амиды ГК с аминокислотами — амид ГК с метиловым эфиром L-гистидина (1).

4. Амиды ГК с урацилами — амид ГК с 6-аминоурацилом (1), амид ГК с 6-амино-2-тиоурацилом (1).

5. Гликопептиды ГК с аминокислотами — с диметиловым эфиром кислоты L-аспарагиновой (1), с метиловым эфиром глицил-L-валина (1), с дибутиловым эфиром - кислоты L-глутаминовой (2).

Получены комплексные соединения ГК с различными веществами: с кислотой ацетилсалициловой (1), с инодометацином (1), с натриевой солью 2-фенилуксусной кислоты (1), с дифенилбутилпиразолидиндионом (1), с фенилдиметилметиламинопиразолоном-5-метансульфатом натрия (1), с различными тиюрацилами (5), с различными простагландинами (4), с алкалоидами: глауцином (1), ди- и три-

*В круглых скобках приведено число патентных источников, сгруппированных по данному виду приемов технологии получения.

берберинами (1). Всего источников информации (68).

Технологические приемы получения комплексов Гк с другими соединениями, образующими с ней так называемые «пролекарства», приобретающие определенные фармакологические свойства, как правило, улучшающие фармакологические свойства исходных соединений, с высоким процентом выхода целевых продуктов, изложены в оригинальных публикациях и обобщены в опубликованном обширном обзоре [6].

3. Получение глицирретиновой кислоты, ее производных и препаратов

Свободная глицирретовая (глицирретиновая) кислота (Гк) в нативном состоянии в растительном сырье, как правило, не содержится. Для ее получения необходимо из сырья выделить сначала глицирризин — глицирризиновую кислоту или ее соли, а затем, с помощью гидролиза или других приемов, получить Гк — агликон Гк. Поэтому патентованных способов получения Гк непосредственно из сырья всего несколько, больше представлено способов получения ее уже из исходной Гк. Следует отметить, что тритерпеновая молекула Гк содержит две основные функциональные группы: по С-3 атому — гидроксильную (спиртовую) группу и по С-30 (29) атому — карбоксильную (кислотную) группу. Обычно они и служат реакционными центрами для присоединения различного рода производных к Гк в зависимости от цели получаемых конечных продуктов, несущих определенно заданную химическую или фармакологическую нагрузку.

Получение Гк из растительного сырья:

1. Первичная обработка растительного сырья водой (1), затем обработка извлечения кислотой уксусной концентрированной с добавлением кислоты серной, отделение и сушка осадка, экстракция его хлороформом с получением «сырой» Гк, обработка осадка спиртом, удаление смеси растворителей, промывка водой остатка с получением ацетилглициррената, из которого с помощью химических превращений получают конечный продукт - 18β-Гк.

2. Обработка сырья диоксидом азота или углерода (1) в надкритическом состоянии под давлением 70-500 кг/см² и при температуре 30-100 °С, выделение конечного продукта по обычной схеме.

3. Обработка сырья водой или органическим растворителем (1), обработка экстракта

сополимерами стирола и дивинилбензола, содержащими amino- или амидные группы, десорбирование конечного продукта аммиачным или щелочным водным раствором.

4. Исходный экстракт, полученный из сырья, растворяют в воде с добавлением минеральной кислоты (1), выделяемый осадок промывают водой и экстрагируют спиртом, к спиртовому извлечению добавляют раствор водной щелочи до нейтральной реакции, водный раствор пропускают через порошок найлона 6 или найлона 66, отделяя примеси (глицирретин при этом адсорбируется на порошке найлона), и далее получают целевые продукты в виде производных Гк.

Известны способы получения α- или β-изомеров глицирретиновой кислоты:

1. Получение 18 α-изомера из 18 β-изомера (2) путем обработки раствора Гк раствором щелочи при нагревании в течение нескольких часов, подкисления раствора и отделения конечного продукта, анализа чистоты и измерения физических констант полученного продукта.

2. Получение β-изомера Гк путем гидролиза Гк или глицирризина (солей): ферментом β-глюкуронидазой, получаемым из культуры микроорганизмов (1) или действием микроорганизмов *Ascomonas* в присутствии азота, кислоты фосфорной и калия (1).

3. Получение производных 3 α-³H-Гк, используемых для радиоиммунологического анализа (2), и способ количественного определения глицирретина (1).

4. Получение из экстракта солодки голой кислоты ликвиритиновой (3 β-окси-11-оксо-18 β-олеан-12-ен-29-овой кислоты) путем кристаллизации её ацетата из метанола, последующего анализа чистоты по физическим параметрам получаемого продукта.

5. Получение 28-гидрокси- и 23,28-дигидрокси-Гк (1).

Получение по С-3 атому - производных Гк:

1. Получение карбенноксолоната — динатриевой соли гемисукцината Гк (1) и наиболее известного производного, предложенного английской фирмой «Biorex Lab.Ltd.», - циклооксолоната натрия (1).

2. Получение сложных 3-ацетил-производных Гк: карбоксипропионила (2), соли с металлами (2), с алкилами и циклоалкилами (2), аминокислотами (2).

Получение по С-30 атому - производных Гк:

1. Получение С-30 спиртов (-олов): гомо- и гетероаннулярных диенов, в качестве БАС (1).

2. Получение сложных производных, содержащих по С-30 остатки сульфокислоты, замещенной этилхлорформиатом, галоидангидридом, аминокансульфокислотой (1).

Получение сложных производных, содержащих заместители одновременно при С-3 и при С-30 (2), а также некоторых С-2 производных (1) и С-26 производных, например, глицирретината колхицина (молекулярное соединение Гк и алкалоида колхицина) (1).

В СНГ (Республика Казахстан) получены 18-дегидро-Гк (глидеринин) и её натриевая соль (1), а также 3-амино-Гк (1) и натриевая соль Δ' -3-кето-Гк (1).

Получаемые производные входят в состав ряда комбинированных фармакологических средств (10) или «пролекарств», в которых Гк (ГК) выступают не только в качестве необычного транспортного средства для доставки лекарства к цели, но и сами являются лекарственным средством. Подробные методы получения оригинальных соединений с высоким процентом выхода изложены в многочисленных частных публикациях и обобщены в опубликованных обзорах [6, 7]. Всего источников информации (42).

4. Получение флавоноидных (фенольных) соединений и препаратов

Спазмолитические свойства, противовоспалительный и противоязвенный эффекты, обнаруженные еще в начале 50-х годов XX века в корнях солодки и экстрактах из нее, предварительно освобожденных от глицирризина, были отнесены на счет флавоноидных соединений солодки. Установлено, что среди флавоноидов корней солодки основным является флаванон-халконовый комплекс гликозидов и агликонов. Исследования зарубежных [11-13] и отечественных [14] ученых расширили эти представления, что способствовало более углубленному изучению всего комплекса фенольных соединений подземной и надземной частей солодки, их выделению, изучению индивидуальных веществ и суммарных препаратов представителей данного класса БАС [8, 14-16].

Так, в 50-60-х годах XX века за рубежом были запатентованы способы получения: флаванонового дигликозида (1) и халконового гликозида (1) из корней солодки. Первичная обработка корней солодки проводилась 95 % этанолом и изобутанолом, сгущение извлечений - под вакуумом.

В первом случае остаток смешивали с этилацетатом, фильтровали и удаляли раствори-

тель, затем смешивали с петролейным эфиром и кристаллизовали, перекристаллизацию проводили из смеси этанол-этилацетат-вода с получением конечного продукта. Во втором - остаток обрабатывали смесью серного и петролейного эфиров, сушили под вакуумом над фосфора пентаоксидом. Затем продукт очищали, растворяя при нагревании в этаноле, охлаждали, фильтровали, смешивали с петролейным эфиром, отстаивали в течение 1 сут. Полученный продукт растворяли в абсолютном этаноле, смешивали с изобутанолом при нагревании, концентрировали под вакуумом и кристаллизовали при охлаждении с выделением конечного продукта.

Представлены способы получения спазмолитического средства из корней с. голой путем многостадийной обработки водно-спиртовых извлечений слабыми растворами щелочей и кислоты хлористоводородной (3) с последующей очисткой на оксиде алюминия (1). Для получения целевого продукта предложен способ обработки спиртового извлечения из корней солодки солью Рейнике или другими реагентами с последующей обработкой осадков органическими растворителями (1).

Известны патенты на способы получения суммарных флавоноидных препаратов из корней солодки для лечения язвенных болезней. Способы основаны на обработке корней органическими экстрагентами (низшие спирты или кетоны) с последующим высаливанием целевого продукта солями неорганических кислот в растворителях различной полярности (2); обработкой слабой кислотой (1) или очисткой на сорбенте (1). Эти способы, как правило, приводили к частичному разрушению природных флавоноидных соединений.

Затем предложены способы последовательного разделения и выделения из экстрактов глицирризина и флавоноидов с помощью различных растворителей, химических реагентов и сорбентов (4). Заслуживают внимания патенты на методы получения флавоноидов с помощью полиамида (1) и других сорбентов (3); интересны способы выделения ряда индивидуальных флавоноидных соединений. Так, из коммерческого экстракта солодки либо из неочищенного глицирризина посредством обработки кислотой в жестких условиях и очистки получают гликозид флаванона (1). Этот способ запатентован в СССР (1).

В США японскими учеными запатентован способ синтеза эхинатина - халконового гликозида, впервые выделенного из корней

с. щетинистой и обладающего лимфобластоидной активностью (1).

Предложен способ получения ликвиритина путем экстракции корней солодки метанолом или этанолом, затем извлечения упаривают при температуре ниже 60 °С, концентрат подвергают распределительной экстракции с использованием водного этанола и н-бутанола, бутанольный слой промывают водой, фильтруют, концентрируют, отстаивают для отделения нерастворимых примесей, осевший осадок растворяют в горячей воде, охлаждают для отделения ликвиритина и перекристаллизовывают его из водного низшего спирта (1).

Известны способы получения препарата с противоопухоловой и антиаллергической активностью на основе выделяемых экстракцией смесью гексана и ацетона или этанола из корней 3-х видов солодки гидрофобных флавоноидов (2). Предложен способ получения фармакологически активных флавоноидов путем экстракции измельченных корней раствором аммиака в свободном спирте при повышенной температуре, подкисления вытяжки, отделения осаждаемой глицирретиневой кислоты, нейтрализации фильтрата аммиаком, концентрирования и сушки готового продукта (1). Это одна из первых попыток последовательного получения одновременно сапонинов и флавоноидов солодки.

Предложен способ получения флавоноидного соединения путем экстракции корней солодки уральской водой и/или спиртом с удалением растворителя, растворения остатка в воде, экстракцией гексаном и хлороформом и очисткой целевого продукта на сорбенте (1).

Получение ликвиритина, ликуразида, ликвиритигенина, нарингенина из водных и/или спиртовых экстрактов корней солодки, очистка их с помощью гельфильтрации на колонке с сефадексом (2).

Предложен способ получения ликохалкона А, изоликофлаванола, гликокумарина путем обезжиривания сырья корня солодки гексаном, экстрагирования его этилацетатом, удаления растворителя, очищения остатка хроматографией на силикагеле, элюирования целевых продуктов смесью хлороформа и метанола (1).

Ранее за рубежом предложены способы целенаправленного получения глицирризиновой кислоты и очищенной суммы флавоноидов:

1. Измельченные корни солодки экстрагируют водой, отфильтровывают и фильтрат пропускают через колонку с зернистым полиамидом, промывают водой, затем элюируют 99 % метанолом флавоноидную фракцию, далее элюируют 85 % метанолом, содержащим 1 н. раствор аммиака, элюат сгущают и получают глицирризинат аммония (1).

2. Корни солодки обрабатывают водной щелочью при нагревании, экстракт обрабатывают кислотой хлористоводородной, осадок фильтруют и обрабатывают метанолом, раствор пропускают через анионит, промывают водой и элюируют 50 % метанолом, содержащим аммиак, элюат сгущают, остаток растворяют в 50 % метаноле и пропускают через катионит, элюат упаривают и получают чистую ГК. Упариванием подкисленной фракции получают флаванон ликвиритигенин (1).

Пожалуй, это всего лишь два известных нам способа получения одновременно и ГК, и флавоноидов с использованием полиамида и ионообменников.

В странах СНГ предложено несколько средств и препаратов на основе флавоноидов из надземной части солодки.

Описан способ выделения пиноцембрина путем экстракции надземной части хлороформом, упаривания извлечения, хроматографирования на силикагеле смесью хлороформа и петролейного эфира и последующей кристаллизацией целевого продукта из смеси хлороформ-гексан, с выходом до 0.9 % от массы сырья. Целевой продукт активнее амидопирина, индометацина и гидрокортизона (1).

Предложен способ выделения гипохолестеринемического средства путем обезжиривания сырья хлористым метилом, затем ацетоном, его экстракции 70-75 % водным ацетоном, удаления экстрагента и сушки суммарного фенольного целевого продукта с выходом до 13 % от массы сырья (1).

На основе выделяемых флавоноидных продуктов запатентовано около десятка различных лекарственных средств [10]. Всего источников информации (44).

Следует отметить, что еще в 60-х годах XX века в ГП ГНЦЛС (бывший ХНИХФИ, ВНИИХТАС, г. Харьков) были разработаны, а затем начали выпускаться медицинской промышленностью оригинальные препараты из солодки (способы их получения были защищены авторскими свидетельствами

СССР): ликвиритон - очищенная сумма флаваноновых гликозидов из корней солодки; лекарственное средство - комбинированный препарат, содержащий халконовый биоизид (ликуразид); защищен метод контроля этого средства по (1). Патентован способ получения левовращающего ликвиритигенина (1) и способ извлечения германия с использованием фенольных комплексов корня солодки (1). Ликвиритон и ликуразид в промышленности получали из 92-96 % этанольных экстрактов из корня солодки путем хроматографической очистки и разделения на полиамидном сорбенте с последующим выделением целевых продуктов с выходами до 1.0 % и 0.1 %, соответственно [8,10, 14,17,18].

Позднее (в 70-80-х годах XX века) в ГП ГНЦЛС была разработана комплексная технология переработки солодки [19] и патентованы [10] по этой технологии способы получения: ликвиритона; ликуразида; суммы халконовых гликозидов; ликвиритина; а также глицирама и сухого экстракта из подземной части солодки по (1); гипохолестеринемического средства, выделяемого из травы солодки голой (1). Для осуществления этой технологии в промышленности разработаны и защищены: способ получения извлечений из растительного сырья; экстрактор для их получения и способ получения полиамида в гранулах для промышленной хроматографии флавоноидов солодки по (1).

Суть комплексной технологии [19] заключалась в предварительном измельчении подземной части солодки голой или солодки уральской вальцеванием до порошка и в последовательном экстрагировании из растительного сырья в специальном экстракторе сначала фенольной, а затем тритерпеновой составляющих. Экстрагентами для этого служили сначала 90 % водный ацетон, затем ацетон, подкисленный 3 % азотной кислотой. Фенольная фракция служила для получения флавоноидных препаратов (ликвиритона, ликвиритина, ликуразида и халкорина), а тритерпеновая — для получения глицирама. Шрот сырья после ацетоновой экстракции использовался для получения медицинского экстракта солодкового корня, шрот сырья после кислотоацетоновой экстракции — для получения технического экстракта солодкового корня.

Выделение флавоноидов: ацетоновый экстракт сгущали до удаления ацетона, остаток экстрагировали горячей водой с отделением полимерных твердых остатков. Водное извле-

чение наносили на батарею адсорберов, заполненных гранулами полиамидного сорбента, и элюировали с заданной скоростью растворами водного спирта в градиенте различных концентраций.

Элюаты с 20 % концентрацией спирта содержали сумму флаваноновых гликозидов, из которой кристаллизацией из сгущенных концентратов выделяли ликвиритин с выходом 0.05 %-0.10 % от массы сырья, а остаток - маточник сушили распылением с получением препарата «Ликвиритон» с выходом до 2 % от массы сырья.

Элюаты с 50 % концентрацией спирта сгущали и из концентратов путем кристаллизации и перекристаллизации из спиртовых растворов получали субстанцию ликуразид с выходом до 0.2 % от массы сырья.

Маточники от перекристаллизации использовали для получения суммы халконовых гликозидов.

Элюаты с 70 % концентрацией спирта в элюенте сгущали, присоединяли маточники от выделения ликуразида и сушили распылением с получением субстанции для препарата «Халкорин» с выходом до 1.0 % -1.5 % от массы сырья.

Выделение глицирама: кислый ацетоновый экстракт обрабатывали 25 % водным аммиаком (или газообразным аммиаком) с получением осадка триаммонийной соли ГК. Осадок отделяли, растворяли при нагревании в концентрированной (ледяной) уксусной кислоте для перевода триаммонийной соли в моноаммонийную соль, охлаждали для кристаллизации продукта, фильтровали осадок. Очистку проводили перекристаллизацией из кислоты уксусной ледяной на первой стадии и из 85 % этанола на последней стадии с получением целевого продукта — моноаммонийной соли ГК (глицирама), с выходом до 2.0 % - 2.5 % от массы сырья. Маточники (сгущенные концентраты после обработки аммиаком и кислотой уксусной) объединяли, нейтрализовывали (щелочью или кислотой) и использовали для получения технического экстракта солодкового корня.

Получение суммарных экстрактов: шрот после ацетоновой экстракции (или кислотоацетоновой экстракции) обрабатывали горячей водой, содержащей 0.25 % аммиака, отделяли жидкую фазу от твердой (шрота) с помощью центробежной центрифуги. Жидкую фазу сгущали до получения густого экстракта солодки или кубовые остатки сушили на распылительной сушилке до получения сухого ме-

дицинского экстракта солодкового корня или сухого технического экстракта солодкового корня с выходом 20.0 % – 25.0 % от массы сырья (шрота).

Предложенная комплексная технология была апробирована в промышленных условиях на ПХФО «Здоровье» (ныне «ООО фармацевтическая компания «Здоровье»» г. Харьков).

Спустя десятилетие (в конце XX века) в Российской Федерации предложены варианты осуществления комплексной технологии переработки солодки: корней [20] и травы [21].

По предложенной [20] технологии используется экстрагент (возможно водно-спиртовая смесь), который позволяет совместить исчерпывающие извлечения из сырья гликозидированных форм тритерпеноидов и флавоноидов. Затем отделяют нативную сумму флавоноидов, одновременно обогащая экстракт ГК. Из нативной суммы флавоноидов получают субстанцию проликвиристон, содержащую до 20 % флавоноидов, из которой 4-кратной экстракцией смесью растворителей: н-бутанол-этилацетат-вода выделяют ликвиристон, затем промывают его водой, сгущают, растворяют в спирте и сушат. Из тритерпеноидной фракции путем ее очистки получают глицирам или сухой и густой очищенные экстракты.

По предложенной [21] комплексной технологии измельченную траву солодки экстрагируют сначала 95 % ацетоном с получением гидрофобной фракции, затем удаляют ацетон, сухой остаток, содержащий не менее 40 % флавоноидных агликонов предложен для производства 3 % мази антимикробного действия. Далее растительный материал обрабатывают 70 % водным ацетоном, удаляют экстрагент, сухой остаток сапонино-флавоноидной фракции, содержащий 28 % тритерпеновых и 12 % флавоноидных гликозидов, предложен для производства 5 % мази противовоспалительного и ангиопротекторного действия. Шрот сырья обрабатывают горячей водой, экстракт концентрируют, полисахариды осаждают ацетоном, твердый остаток фильтруют, очищают и сушат продукт, содержащий не менее 10 % нейтральных сахаров и белковых веществ. После отделения полисахаридов фильтрат концентрируют и сушат с получением аминокислотной фракции, содержащей не менее 22 % суммы аминокислот и 2.5 % оксикоричных кислот. Полисахарид-

ная и аминокислотная фракции в виде гранул предложены в качестве иммуностимулирующего и желчегонного препаратов, соответственно. Оставшийся растительный материал после сушки может быть использован в качестве корма для животных.

5. Получение полисахаридов (очищенные фракции углеводов)

Из других основных БАС солодки запатентован ряд способов получения высокомолекулярных углеводов (полисахаридов).

В одном случае корни солодки обрабатывают горячей водой, извлечение сгущают, затем с помощью диализа получают сумму полисахаридов (1).

В другом - полученный из корня солодки подщелоченный водный экстракт после отделения глицирризина фракционируют методом ультрафильтрации на различных мембранах с получением фракций высокомолекулярных соединений, в т.ч. полисахаридов с молекулярной массой в пределах 1-30 тыс (1).

В зарубежной литературе описаны методы получения и химической расшифровки некоторых очищенных субстанций фракций полисахаридов: глицирризина GA, полученного из столонов с. голой, глицирризина UA, выделенного из корней с. уральской [22, 23] и полисахаридов из корней с. уральской: глицирризина UA и глицирризина UB [24]. Так, корни солодки из Китая первоначально экстрагируют горячей водой, извлечение осаждают этанолом, осадок обрабатывают горячей водой, центрифугируют, обрабатывают реагентами и получают фракции с выходом 0.15 % и 0.015 %. Далее гомогенезат обрабатывают с помощью гель-хроматографии, выделяя очищенные фракции названных полисахаридов, проводят расшифровку углеводных последовательностей и характеризуют. Например, глицирризан UC характеризуют как арабино-3,6-галактоглюкановый тип полисахарида с молекулярной массой 69 тыс, состоящий из L-арабинозы, D-галактозы, D-глюкозы, L-рамнозы в молярном соотношении 10:30:27:1, полисахарид линейно-разветвленного типа [25].

Предварительные исследования отечественных авторов также дают возможность характеризовать выделяемые фракции полисахаридов из травы с. голой как гликуроногликаны, состоящие в основном из кислоты галактуроновой, галактоарабана с включениями глюкозы, рамнозы и ксилозы, из корней - как глюкан (крахмал) и полисахарид груп-

пы гликуроногликанов, состоящий в основном из кислоты галактуроновой, галактоаробана с включением рамнозы и ксилозы. Получаемые фракции полисахаридов выделяют из обезжиренной надземной части или сразу из корней с помощью обычных методов экстракции, фракционирования и очистки углеводов [26].

Таким образом, представленные в кратком обзоре технологические приемы выделения и получения некоторых компонентов, содержащихся в солодке БАС, очищенных субстанций и индивидуальных соединений свидетельствуют о многообразии методов получения, постоянном их совершенствовании и перспективах дальнейшего исследования в этой области с целью создания новых технологий различных лекарственных препаратов из солодки.

6. Получение препаратов различного назначения

В патентной литературе и научной периодике приведены многочисленные технологические приемы получения препаратов и комбинированных продуктов для косметично-парфюмерного применения, ветеринарной медицины и для создания различных биологически активных добавок (БАД) или пищевых добавок. В них солодка применяется или как растительное сырье в сборах с другими растениями, например, для создания различных алкогольных или безалкогольных напитков, бальзамов или пищевых добавок, или как сырье для выделения БАС и комплексов, вводимых в различные продукты.

Технологии получения таких продуктов общеизвестны и особого интереса не представляют, то есть это приемы получения косметических препаратов, пищевых продуктов или БАД, напитков или бальзамов и других продуктов, содержащих компоненты, выделяемые из солодки: суммарные извлечения, индивидуальные ГК и Гк (их производные), флавоноиды, полисахариды и другие компоненты. Масштаб таких сведений только патентной информации довольно внушителен: для зарубежных стран он составляет около 100 источников, а для стран СНГ - свыше 50 источников [10].

Всего по источникам патентной информации только по технологии получения различных продуктов зафиксировано около 390 источников от общего числа около 700, т.е. 55 % от всей зафиксированной патентной информации.

Выводы

Анализируя источники патентной информации, научной периодики по технологии переработки солодки и получения продуктов из нее, следует отметить стабильный интерес к солодке как источнику сырья для получения целого ряда БАС и других полезных соединений и средств. Об этом свидетельствует постоянный рост числа охранных документов по общему использованию солодки и получаемых из нее препаратов, в том числе и по технологиям получения субстанций.

Следует отметить, что большинство патентованных технологических разработок на получение средств и препаратов приходится на само растительное сырье — солодку, а также на тритерпеновые соединения и получаемые на их основе различные производные и молекулярные комплексы с широким спектром лечебного и биологического действия.

В последнее время предложен ряд оригинальных методов получения препаратов на основе флавоноидных и тритерпеновых соединений солодки, выпускаемых в России [18].

Все это подтверждает то, что солодка вышла на первое место среди цветковых лекарственных растений по частоте применения в медицине [27]. Лекарственные средства из солодки относятся к 12 фармакотерапевтической группам [28]. Продолжается интенсивное изучение сапонинового (тритерпенового) и фенольного комплексов солодки [29, 30], применение в БАД [31].

Солодка нашла широкое применение не только в медицине и ветеринарии, но и в пищевой промышленности, а также в составе косметических, парфюмерных средств и препаратов общего использования.

Большие потенциальные возможности имеются также в области создания технологий выделения и применения средств на основе других БАС и комплексов (например, аминокислот, пектинов, углеводов, микроэлементов и др.), содержащихся в солодке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брехман И.И. Пора браться за солодку // Знание-сила. - 1972. - № 6. - С. 20-22.
2. Телятьев В.В. Целебные клады Восточной Сибири. - Иркутск: Вост.-Сибирское изд-во, 1976. - 446 с.
3. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. - М: Медицина, 1978. - 656 с.
4. Tyler V.E. Pharmacognosy (9th edition). - Philadelphia: Lea & Febiger, 1988. - 519 p.
5. Вандышев В.В. Лакрица - лекарственное растение // Мед. помощь. - 2001. - № 4. - С. 42-46.
6. Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. Глицирризиновая кислота (обзор) // Биоорганическая химия. - 1997. - Т. 23, № 9. - С. 691-709.

7. Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Сердюк Н.Г. Глицирретовая кислота (обзор) // Хим.-фармац. журн. - 1998. - Т. 32, № 8. - С. 5-14.

8. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. Фенольные соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. // Растит. ресурсы. - 1995. - Т. 31. - Вып. 3. - С. 116-145.

9. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hydrangeaceae — Haloragaceae. - Л.: Наука, 1987. - С. 136-144.

10. Аммосов А.С., Литвиненко В.И., Попова Т.П. Использование солодки в мировой практике: обзор патентных источников // Хим.-фармац. пр-во: Обзорная информ. - М.: НИИЭМП, 1998. - Вып. 1. - 83 с.

11. Berger H., Holler H. Zur Kenntnis der Flavonoide. 1. Die spasmolytischen Wirkstoffe von *Glycyrrhiza glabra* L. // Sci.Pharm. - 1957. - No. 1. - S. 25.

12. Ikram M., Zirvi K.A. Chemistry and pharmacology of licorice (Genus *Glycyrrhiza*) // Herbol. - 1976. - Vol.22, No. 3. - P.312-320.

13. Revers F.E. Clinical and pharmacological investigation on extract of licorice // Acta Med.Scand. - 1956. - Vol. 154, No. 6. - P. 749.

14. Литвиненко В.И., Оболенцева Г.В. Химическое и фармакологическое исследование флавоноидов солодки голой (*G. glabra* L.) и солодки уральской (*G. uralensis* Fisch. et Mey.) // Мед. пром-сть СССР. - 1964. - Т. 18, № 10. - С. 20-23.

15. Torck M. Revue de phytochimie: les flavonoides leguminosés // Fitoterapia. - 1976. - No. 5. - P. 135-242.

16. Fenwick G.R., Lutowski J., Nieman C. Luquorice, *Glycyrrhiza glabra* L. - composition, uses and analysis // Food Chemistry. - 1990. - Vol. 38. - P. 119-143.

17. Изучение и использование солодки в народном хозяйстве СССР // Материалы IV симпозиума. - Алма-Ата: Гылым, 1991. - 196 с.

18. Регистр лекарственных средств России. РЛС-АПТЕКАРЬ. - 2003. - Вып. 5. - С. 348, 593.

19. Аммосов А.С. Химическое исследование и комплексная переработка солодки: Автореф. дис. ... к.фарм.н. - Харьков, 1988. - 23 с.

20. Бибикина Н.Е. Комплексная технология переработки корня солодки: Автореф. дис. ... к.фарм.н. - М., 1999. - 24 с.

21. Takada K. Core structure of glycyrrhizic acid, the main polysaccharide from the stolon of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*, anti-complementary and alkaline phosphatase — inducing activities of the polysaccharide and its degradation products // Chem. Pharm. Bull. - 1992. - Vol. 40, No. 9. - P. 2487-2490.

22. Сампиев А.М. Экспериментально-теоретическое обоснование технологии препаратов с сапонино-флавоноидными композициями при комплексной переработке растительного сырья: Автореф. дис. ... д.фарм.н. - Пятигорск, 1998. - 47 с.

23. Shimizu N., Tomoda M., Takara K., Gonda R. The core structure and immunological activities of glycyrrhizic acid the main polysaccharide from the root of *Glycyrrhiza uralensis* // Chem. Pharm. Bull. - 1992. - Vol. 40, No. 8. - P. 2125-2128.

24. Tomoda M., Shimizu N., Kanari M., et al. Characterization of two polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Glycyrrhiza*

uralensis // Chem. Pharm. Bull. - 1990. - Vol. 38, No. 6. - P. 1667-1671.

25. Shimizu N., Tomoda M., Kanari M., et al. A novel neutral polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Glycyrrhiza uralensis* // Chem. Pharm. Bull. - 1990. - Vol.38, No. 11. - P. 3069-3071.

26. Чушенко В.М., Литвиненко В.И., Аммосов О.С. та ін. Вуглеводи трави та коріння солодки голої // Фармац. журн. - 1996. - № 3. - С. 63-67.

27. Быков В.А., Запесочная Г.Г., Куркин В.А. и др. Солодка: проблемы рационального использования сырья // Современ. состояние и перспективы науч. исслед. в области фармации: Тез. докл. науч.-практ. конф., посвящ. 25-летию фармац. факультета Самарского гос. мед. ун-та. - Самара, 1996. - С. 113-114.

28. Оболенцева Г.В., Литвиненко В.И., Аммосов А.С. и др. Фармакологические и терапевтические свойства препаратов солодки (обзор) // Хим.-фармац. журн. - 1999. - Т. 33, № 8. - С. 24-31.

29. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. Природные тритерпеновые соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. (обзор) // Фармаком. - 2002. - № 4. - С. 30-48.

30. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. Фенольные соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. // Фармаком. - 2003. - № 2. - С. 34-80.

31. Федеральный реестр биологически активных добавок к пище / Под ред. Пилат Т.А. - М.: Когелет. - 2000. - 327 с.

Резюме

Аммосов О.С., Литвиненко В.И.

Солодка: технология препаратов (стислий огляд)

Узагальнено відомості з основних технологічних розробок, представлених у доступній патентній і науковій періодичній літературі за останні десятиріччя, що відбивають методи комплексної переробки солодки, одержання з неї очищених субстанцій, що використовуються для створення медичних препаратів та інших продуктів.

Summary

Ammosov A.S., Litvinenko V.I.

Licorice: technology of preparations (brief overview)

The data on basic technological developments presented in available patent and periodical scientific literature for last decades and reflecting the methods of licorice complex processing, as well as of obtaining of purified substances used for medicinal preparation and other products from one are summarized.

Аммосов Алексей Серафимович (р. 1940). Окончил Ленинградский химико-фармацевтический институт. Работает в ГП ГНЦЛС (с 1970). К.фарм.н. (1988). Ст. науч. сотрудник сектора химии и технологии фенольных препаратов.

Литвиненко Василий Иванович (р. 1932). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Д.х.н. (1990). Профессор (1991). Академик ИА Украины (2000). Зав. сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

УДК 582.736.3

Литвиненко В.И., Бубенчиков Р.А., Попова Н.В.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»
Национальный фармацевтический университет
Государственный медицинский университет, г. Курск

Фиалка трехцветная и фиалка полевая: химический состав и применение

Представлен обзор современных данных по изучению химического состава и применения видов фиалки. Фиалка трехцветная и фиалка полевая отличаются большим разнообразием биологически активных веществ (флавоноидов, кумаринов, фенолкарбоновых кислот, полисахаридов) и обладают широким спектром фармакологического действия: отхаркивающим, антимикробным, мочегонным, противовоспалительным, антиаллергическим. Эти виды, наряду с другими видами фиалок, могут быть использованы для дальнейшего изучения и разработки новых лекарственных препаратов.

Род фиалка (*Viola* L.) относится к семейству фиалковых (*Violaceae*), широко распространено по всему земному шару, особенно в тропических и субтропических областях [22].

Род фиалка — единственный представитель во флоре нашей страны этого обширного и многообразного семейства [25].

Род фиалка (*Viola*) включает 900 видов, ареал которых распространяется от Арктики на севере до Огненной Земли и Фолклендских островов, а также Австралии, Новой Зеландии - на юге [25].

Жизненные формы фиалок разнообразны, они представлены многолетними, редко однолетними травянистыми растениями (в России), с развитым олиственным стеблем или бесстебельные растения с розеткой прикорневых листьев, нередко со столонами; еще реже полукустарниками. Некоторые фиалковые (ползучие кустарники или лианы влажного тропического леса) совершенно не похожи на те, что растут у нас [25].

Растения рода фиалка имеют очередные листья, иногда собранные в прикорневую розетку. Цветки неправильные, одиночные, пазушные, на цветоножках с 2 прицветниками. Чашечка из 5 почти одинаковых чашелистников с небольшими, обращенными книзу придатками. Нижний лепесток со шпорцем или мешковидным выростом. Тычинки с широкими свободными, очень короткими нитями и со связниками, оттянутыми в треугольные придатки, 2 передние тычинки с нектарниками при основании. Столбик обычно изогнутый, нередко с клювиком. У многих видов наблюдаются нераскрывающиеся клейстогамные цветки с недоразвитым венчиком и 2 — 5 тычинками. Плод — коробочка, обычно растрескивающаяся 3 створками и разбрасывающая семена. Семена с мясистым присемянником или без него [25].

Фиалка трехцветная — европейский вид, встречающийся в Сибири лишь как заносное растение. Широко распространена по всей европейской части страны [25].

Фиалка полевая — распространена в Европейской части России и Западной Сибири [25].

Места обитания фиалок также разнообразны. Фиалки приспособлены к различным экологическим условиям: обитают на опушках, полях, просеках, среди зарослей кустарников, на лугах, на склонах балок и оврагов; на сельскохозяйственных угодьях, сухих залежах, паровых полях, в посевах различных культур, парках, на огородах, обочинах дорог, железнодорожных насыпях. В тропических и субтропических областях фиалки растут в горах, встречаясь на высоте до 4600 м в Перу и Боливии [25].

Лечебные свойства фиалок были известны с глубокой древности.

На Руси длительное время фиалку применяли при чесотке, дерматитах, хронической экземе [34]. В римской мифологии она упоминается как «цветок Юпитера» [34].

Рядом авторов проводилось изучение биологически активных веществ, содержащихся в фиалке трехцветной и фиалке полевой. Было установлено наличие фенольных соединений, сапонинов, полисахаридов и других соединений. Наиболее широко в изучаемых растениях представлены фенольные соединения. Из них обнаружены и идентифицированы флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, дубильные вещества [20].

Флавоноиды обнаружены как в фиалке трехцветной, так и в фиалке полевой, но наиболее полно они изучены в фиалке трехцветной. Флавоноидные соединения фиалки трехцветной представлены кверцетином, лютеолином, лютеолин-7-гликозидом, рути-

ном (виолакверцетином). Содержание рутина в листьях фиалки составляет до 0.15 %, в стеблях - до 0.1 %, в корнях - 0.05 %, в семенах и цветках - следы. Наряду с О-гликозидами флавоноидов из травы фиалки трехцветной выделен целый ряд С-гликозидов-флавонов: витексин и изовитексин (сапонаретин), (8-С- и, соответственно, 6-С - глюкозилапигенин); ориентин и изоориентин (8-С и 6-С - глюкозиллютеолин), виценин - 2 и виолантин (6,8 - ди - С и, соответственно, 6 - С-рамнозил-8-С-глюкозилапигенин), скопарин, сапонарин. В фиалке полевой обнаружен только рутин; его содержание колеблется от 0.15 % до 0.45 % в траве; в листьях - до 0.13 %, в стеблях - 0.08 % [20, 30, 34].

В цветках фиалки трехцветной найдены антоцианы: виоланин, дельфинидин и его 3-глюкозид, цианидин, 3-глюкозид пеонидина, которые обуславливают их окраску [28, 32, 33]. Антоциан виоланин обнаружен и в цветках фиалки полевой [20].

Фенолкарбоновые кислоты фиалки трехцветной представлены кофейной, п-кумаровой, гентизиновой, протокатеховой кислотами. Их содержание составляет 0.18 %. Наряду с ними содержится кислота салициловая и ее производные, такие как метилсалицилат и виолутозид (глюкозидоарабинозид метилового эфира кислоты салициловой). Фиалка полевая содержит кислоту салициловую и ее метиловый эфир [27, 34, 20].

Дубильные вещества обнаружены только в траве фиалки трехцветной; их содержание составляет 2.4 % - 4.5 % [16, 20].

В траве фиалки трехцветной установлено и наличие кумарина умбеллиферона [2].

Литературные данные о наличии сапонинов в фиалке трехцветной спорные. Одни авторы указывают на их наличие, другие говорят об их отсутствии, а указывают на наличие гемолитически активных пептидов [34].

Как фиалка полевая, так и фиалка трехцветная содержат эфирное масло, состоящее в основном из метилового эфира кислоты салициловой. Его содержание в фиалке трехцветной и полевой составляет 0.01 % [20].

Другим, не менее важным классом биологически активных соединений, содержащихся в фиалках, являются углеводы. Углеводы фиалки трехцветной представлены полисахаридами, в т.ч. и пектиновыми веществами. Наличие полисахаридов установлено в надземной части, их выход составил от 8.5 % до 13 %. Максимальное количество полисахаридов накапливается в период цветения. Методом

хроматографического анализа на бумаге было доказано наличие в гидролизатах полисахаридных комплексов глюкозы, галактозы, арабинозы, ксилозы, рамнозы, галактуроновой кислоты [8, 29]. При проведении исследований по выявлению во флоре Литвы видов, накапливающих слизи, литовские ученые установили, что у видов рода *Viola L.* основное накопление слизи происходит в надземной части, в основном в эпидермисе листьев [19].

Пектиновые вещества были получены экстракцией травы фиалки трехцветной смесью 0.5 % растворов кислоты щавелевой и оксалата аммония (1:1) при температуре 70 °С. Выход их составил 4.6 %. В гидролизатах пектиновых веществ методом бумажной хроматографии идентифицировали кислоту галактуроновую, глюкозу, галактозу [8].

При изучении фиалок внимание исследователей привлекали и витамины. Присутствие кислоты аскорбиновой обнаружено в фиалке трехцветной и фиалке полевой.

Наличие каротиноидов в фиалке полевой установлено только качественно, а в фиалке трехцветной они разделены на отдельные компоненты и установлена их структура. Каротиноиды фиалки трехцветной представлены виолоксантином, ауроксантином, флавоксантином, зеаксантином, лютеином, лютеоксантином, каротином, ликонином и их производными [20]. Кроме каротиноидов и витамина С листья фиалки полевой содержат витамин К, а листья фиалки трехцветной - витамин Р.

Среди других классов природных соединений в семенах фиалки трехцветной и фиалки полевой найдено жирное масло. В корнях фиалок содержится алкалоид виолаэметин [20].

В настоящее время в научной медицине России фиалка трехцветная и фиалка полевая используются в качестве отхаркивающего средства [6, 13]. Отхаркивающий эффект связан, главным образом, с содержанием в растении сапонинов и слизеподобных веществ. Прием настоя фиалки вызывает усиление секреции бронхиальных желез, облегчает отделение мокроты, успокаивает кашель [8, 9, 23, 24]. Назначают ее при воспалительных заболеваниях органов дыхания (острых респираторных заболеваниях, трахеитах, бронхитах, бронхопневмониях) [7, 9, 23, 24]. Однако в больших дозах настой фиалки может вызвать рвоту (раздражающее действие «сапонинов») [9, 23]. Трава фиалки в медицинс-

кой практике используется для приготовления настоя, а также входит в состав отхаркивающих сборов [23, 26].

Трава фиалки трехцветной в смеси с другими растениями: корнями и корневищами девясила, семенами тмина, травой сессюреи входит в состав средства, применяемого для лечения бронхиальной астмы [18].

Не менее известна фиалка и как диуретическое средство и в связи с этим назначается при застойных явлениях, заболеваниях мочевого пузыря, для лечения мочекаменной болезни [22, 23, 9]. Мочегонное действие фиалок оспаривается, т.к. после принятия настоя внутрь количество выделяемой мочи не увеличивается, но усиливается выделение хлоридов [34].

Наличие в растении слизеподобных веществ и эфирного масла оказывают противовоспалительное действие, которое используют для лечения воспалительных процессов в желудочно-кишечном тракте и дизентерии [17, 31]. Не менее активным компонентом травы фиалки считается и флавоновый гликозид виолакверцетин (рутин), который при местном и при резорбтивном действии способствует уплотнению клеточных мембран, замедляя всасывание различных веществ воспалительными тканями, что характерно для противовоспалительного действия флавоноидов [34].

При приеме препаратов фиалки внутрь кроме местного противовоспалительного эффекта наблюдается также некоторое спазмолитическое и желчегонное действие. Препараты фиалки подобно рутину тормозят развитие травматического отека у крыс, оказывают противовоспалительное действие на модели декстранового отека, а также снижают проницаемость сосудов и дают выраженный гипосенсибилизирующий эффект [34]. Настой фиалки трехцветной оказывает губительное действие на простейших [17]. Фиалка трехцветная и сборы, ее содержащие, благодаря содержащимся флавоноидам, ненасыщенным жирным кислотам, слизям, солям магния могут применяться для предупреждения инфаркта миокарда [31]. Препараты травы фиалки оказывают антисептическое и десенсибилизирующее действие. Она применяется в стоматологической практике при лечении воспалительных процессов слизистой оболочки полости рта, при пародонтозе, зубной боли и гиповитаминозе С [11].

Противовоспалительные и противоаллергические свойства фиалок положительно

проявляются при аллергическом дерматите (диатезе), экземе, псориазе, трофических язвах [34].

Фиалка трехцветная находит применение и в акушерско-гинекологической практике. Она способствует сокращению матки в послеродовом периоде [14].

Женщинам, перенесшим тяжелые роды, бабки-повитухи давали чай, состоящий из 2 частей травы фиалки трехцветной и равных частей травы череды, листьев грецкого ореха и листьев земляники, обладающий, по их мнению, «кровоочистительным» действием, а также с целью ускорения сокращения матки в послеродовый и послеабортный период. Вышеуказанный настой использовали и при обильных менструациях, связанных с воспалительными заболеваниями матки [15].

В народной медицине широко используются и другие свойства фиалки трехцветной и фиалки полевой.

Водный настой, сироп и сок из свежей травы в смеси с медом применяется в качестве отхаркивающего и противовоспалительного средства при сильном кашле, бронхите, грудных болях, воспалении легких, туберкулезе, воспалении горла [9, 15]. Настой растений рекомендуется и при простудных заболеваниях, сопровождающихся высокой температурой [15].

В народной медицине фиалку употребляют при различных кожных заболеваниях — экземе, псориазе, аллергическом дерматите, экссудативном диатезе, угрях, язвах, чешуйчатом лишае [4, 17]. В таких случаях она одновременно используется внутрь и наружно в виде примочек, компрессов, обмываний. В виде примочек наружно находит применение при жирной себорее кожи лица и головы [3]. Для лечения диатеза популярен так называемый «аверин чай», в состав которого входит трава фиалки, череды и паслена сладкого в соотношении 4:4:1 [15, 4].

Настой травы рекомендуется при атеросклерозе, сердечных приступах, воспалении суставов и рахите у детей, что связано с достаточно большим содержанием в ней витамина С и каротиноидов [5, 9].

Настой фиалки трехцветной известен и как народное средство против амёбной дизентерии [20].

Народные целители рекомендуют использовать фиалку трехцветную для лечения рака любой локализации, в том числе и его наружных форм, в виде припарок из листьев [1], а также для лечения венерических заболеваний [15].

Как мочегонное, а отчасти потогонное, регулирующее обмен, кровоочистительное средство, чай из травы фиалки применяют при ревматизме, подагре, артритах [4, 5, 15].

Фиалка трехцветная и фиалка полевая обладают также седативным действием и находят применение при эпилепсии, бессоннице, нервных расстройствах [3, 20].

В литературе имеются данные об использовании цветков и листьев фиалок в смеси с семенами укропа и лакричного корня для лечения желтухи [20].

Кроме этого, корни фиалки полевой и фиалки трехцветной используются в народе как рвотное средство при отравлениях [12], а надземная часть фиалки полевой - при астении и анемии [21].

Фиалка трехцветная нашла широкое применение не только в России, но и за рубежом. Она описана в Фармакопеях Нидерландов, Югославии, Германии, Польши, Австрии, Турции [20].

Так, например, в болгарскими медиками она рекомендуется при кожных заболеваниях, ревматизме, подагре, атеросклерозе. Назначается при заболеваниях верхних дыхательных путей и как мочегонное средство [10].

За рубежом выпускаются препараты, приготовленные из фиалки трехцветной. Настойка анютиных глазок входит в состав препарата для лечения кожных заболеваний «Antipsoricum N Truw», масло фиалки трехцветной вместе с другими растительными экстрактами входят в состав дерматологического препарата «Befelka» [34].

Таким образом, фиалка трехцветная и фиалка полевая отличаются наличием большого разнообразия биологически активных веществ (флавоноидов, кумаринов, фенолкарбоновых кислот, полисахаридов) и обладают широким спектром фармакологического действия: отхаркивающим, антимикробным, мочегонным, противовоспалительным, антиаллергическим. Фиалка трехцветная и фиалка полевая, наряду с другими видами фиалок, могут быть использованы для дальнейшего изучения и разработки новых лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балицкий К.П., Воронцова А.П. Лекарственные растения и рак. - Киев, 1982. - 375 с.
2. Бубенчиков Р.А. Фитохимическое и фармакологическое изучение растений рода фиалка: Автореф. дисс. ... к.мед.н. — Купавна, 2002. — 23 с.
3. Волягина-Малютина Е.Т. Лекарственные растения. - СПб: Изд-во «Специальная литература», 1996. - 233 с.

4. Гаммерман А.Ф., Блинова К.Ф., Бадмаев А.Н. Антимикробные свойства лекарственных растений тибетской медицины // Фитонциды. - Киев, 1967. - С. 107-114.
5. Горбунова Т.А. Атлас лекарственных растений. - М.: Аргументы и факты, 1995. - 352 с.
6. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989. - 400 с.
7. Губанов И.А. Лекарственные растения. - М.: Изд-во МГУ, 1993. - 1993. — 270 с.
8. Забазная Е.И. Полисахариды *Viola tricolor* // Химия природных соединений. - 1985. - № 1. - С. 113.
9. Завражнов В.И. Лекарственные растения. - Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1993. - 478 с.
10. Зимин В.М. Библиотечка лекарственных растений: собрание народной и научной медицины. - СПб.: АО «Дорваль», 1993. - Т. 1. - 266 с.
11. Лекарственные растения в стоматологии / Под ред. И.С. Чекмана. - 2-е изд. - Кишинев: Штиинца, 1989. - 184 с.
12. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. - Саратов, 1967. - 559 с.
13. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. - 14-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2000. - Т. 1. - 540 с.; Т. 2. - 608 с.
14. Михайленко Е.Г., Радзинский В.Е., Захаров К.А. Лекарственные растения в акушерстве и гинекологии. - Киев: Здоровье, 1987. - 192 с.
15. Носаль М.А., Носаль И.М. Лекарственные растения и способы их применения в народе. - Киев: Медгиз, 1960. - 256 с.
16. Обследование растений флоры Северо-Запада РСФСР на содержание флавоноидов, кумаринов, проазуленов и других фармакологически активных соединений / Б.А. Шухободский, А.П. Марков, Л.В. Кузьмина и др. // Биология и химия растений - источников фенольных соединений и алкалоидов. - Л., 1972. - С. 117-136.
17. Пастушенков Л.В. Растения - друзья здоровья. - Л.: Лениздат, 1989. - 191 с.
18. Патент № 2128053. РФ, А61К 35/78. Средство для лечения бронхиальной астмы. Налепо Л.Ф. (РФ). - 4 с.
19. Пясяцкене А.А., Яковлева О.В., Вайчунене Я.А., Абрутис В.А. Образование слизи у видов рода *Viola L.*, произрастающих в Литве // Раст. ресурсы. - 1991. - Т. 27. - Вып. 1. - С. 10-21.
20. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав и использование. Семейства *Raemoniaceae - Thymelaeaceae*. - Л.: Наука, 1985. - 336 с.
21. Рубине Е.А. Лекарственные средства латышской народной медицины. // Наука - практике фармации. - Рига, 1974. - С. 62-67.
22. Травянистые растения СССР / Под ред. Т.А. Работнова: В 2 т. - М.: Мысль, 1971. - Т. 2. - 312 с.
23. Турова А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. - М.: Медицина, 1974. - 424 с.
24. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / Под ред. В.Г. Кукеса. - М.: Медицина, 1999. - 192 с.
25. Флора СССР: В 30 т. - М., Л.: Изд-во АН СССР, 1934-1964. - Т. XV. - 1941. - 742 с.
26. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. - СПб.: Специальная литература, 1999. - 407 с.
27. Bate-Smith E.E. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance // Bot. J. Linn. Soc. - 1962. - Vol. 58, No. 371. - P. 95-173.
28. Endo T. Biochemical and genetical investigations of flower color in *Viola tricolor L.* // Jap. J. Bot. - 1954. - Vol. 14, No. 2. - P. 187-193.

29. Franz G. Untersuchungen uber die Schleimpolysaccharide von Tussilago farfara, Symphytum officinalis, Borago officinalis and Viola tricolor // Planta Med. - 1969. - Jg. 17. - H. 3. - S. 217-220.
30. Horhammer L., Hansel R. Zur analytic flavone. II. Uber Komplexbildungsvermogen einiger oxyflavone und die Konstitution in des Polygonum hydropiper ver Komenden Phamnasinesters // Arch. Pharm. - 1953. - Bd. 286, H. 8. - S. 425-431.
31. Papay V., Molnор B., Lepron I., Toth L. A Viola tricolor L. kemiai anyagainak vizsgalata // Acta Pharm hung. - 1987. - Vol. 57, No. 3-4. - P. 153-158.
32. Takeda K., Hayashi K. Analytical evidence for the presence of tryglycosidic pattern in violamin // Bot. Magasine. Tokyo. - 1963. - Vol. 76, No. 900. - P. 206-214.
33. Takeda K., Hayashi K. Crystallization and some properties of the genuine anthocyanin inherent to the deep violet color of pansy // Proc. Jap. Acad. - 1965. - Vol. 41. - № 6. - P. 449-454.
34. Teedrogen und Phytopharmaka // Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart. - 1997. - P. 619-622.

Резюме

Литвиненко В.І., Бубенчиков Р.О., Попова Н.В.

Фіалка триколірна та фіалка польова: хімічний склад та застосування

Представлено огляд сучасних даних із вивчення хімічного складу та застосування видів фіалки. Фіалка триколірна та фіалка польова відрізняються великим різноманіттям біологічно активних речовин (флавоноїдів, кумаринів, фенолкарбонових кислот, полісахаридів) і мають широкий спектр фармакологічної дії: відхаркувальну, антимікробну, сечогінну, протизапальну, антиалергічну. Ці види, поряд з іншими видами фіалки,

можуть бути використані для подальшого вивчення та розробки нових лікарських препаратів.

Summary

Litvinenko V.I., Bubenchikov R.A., Popova N.V.

Viola tricolor and Viola arvensis: chemical composition and use

The review of modern data on study of chemical composition and use of violet species is presented. *Viola tricolor* (garden violet) and *Viola arvensis* (field violet) are characterized by a great variety of biologically active substances (flavonoids, coumarins, phenol carboxylic acids, polysaccharides) and possess a wide spectrum of pharmacological effects: expectorative, antimicrobial, diuretic, anti-inflammatory, antiallergic. These species, together with other violet species, may be used for further study and development of new medicinal products.

Литвиненко Васильй Іванович (р. 1932).

Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Д.х.н. (1990). Профессор (1991). Академик ИА Украины (2000). Зав. сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

Бубенчиков Роман Александрович (р. 1976).

Окончил Курский государственный медицинский университет (1999). К.мед.н. (2002). Врач стационара ОККВД (г. Курск).

Попова Наталия Вячеславовна. Окончила

Харьковский фармацевтический институт (1981). К.фарм.н. Доцент кафедры фармакогнозии Национального фармацевтического университета.

Стандартизація лікарських засобів

УДК 615.453:[543.544.3:615.074]

Зинченко А.А., Котова Э.Э., Чибилев Т.Х.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

ЗАО «Верофарм», г. Москва

Определение остаточных количеств воды в лиофилизированных лекарственных препаратах методом газовой хроматографии

Разработана методика количественного определения остаточных количеств воды в лиофилизированных препаратах методом газовой хроматографии (ГХ). Методика позволяет определять содержание воды в диапазоне до 15 % при массе содержимого флакона от 10 мг. Определение проводят без вскрытия флакона, что позволяет снизить ошибку определения.

В тех случаях, когда сохранность действующего вещества, используемого в инъекционном лекарственном препарате, не может быть обеспечена в растворенном состоянии, используют лиофилизацию, т.е. сублимацию замороженного раствора действующего вещества при низких температурах и пониженном атмосферном давлении. При лиофилизации биологически активные вещества претерпевают минимальные химические превра-

щения, а сами лиофилизированные препараты способны продолжительное время храниться без изменения фармакологических свойств [1,2].

Одним из основных дестабилизирующих факторов, влияющих на сохранность лиофилизированных препаратов, является количество остаточной воды в лиофилизированной массе, поэтому контроль за содержанием воды в препарате является актуальной зада-

чей в производстве лиофилизированных лекарственных форм.

Основными методами определения воды в лиофилизированных лекарственных формах являются метод К. Фишера и метод определения потери в массе при высушивании в вакууме над фосфора пентаоксидом. Эти методы требуют взятия точной навески лиофилизованного препарата в количестве не менее 0.5 г. Поскольку практически все лиофилизированные препараты являются крайне гигроскопичными веществами, все работы, включая вскрытие флаконов, взятие навесок, проведение самих измерений, необходимо выполнять в герметичных боксах с тщательно высушенным воздухом или инертным газом. Даже принимая такие меры предосторожности, нельзя гарантировать получение достоверных результатов традиционными методами, так как в процессе проведения всех операций в сухой атмосфере возможна частичная потеря воды из пористой массы препарата. Поэтому разработка методики, которая позволяла бы быстро и достоверно определять содержание остаточных количеств воды в лиофилизованной массе, остается весьма актуальной задачей для производства и контроля лиофилизированных инъекционных препаратов.

Представленная ниже методика была разработана для определения остаточных количеств воды в препарате «Винкрестин, порошок лиофилизированный для инъекций», представляющем собой гигроскопичную пористую лиофилизированную массу во флаконе вместимостью 10 мл следующего состава: винкрестина сульфата 1.0 мг или 0.5 мг, вспомогательных веществ — около 10 мг. Предельно допустимая концентрация воды для данного препарата 7 %, что составляет около 0.7 мг на флакон. Из этих данных можно вычислить, что если растворить содержимое флакона в 0.2 мл безводного растворителя, концентрация воды в растворе может достигать 3.5 мг/мл. При вскрытии флакона объемная пористая масса препарата в течение 1-10 мин расплывается на воздухе из-за поглощения воды, поэтому при разработке методики было принято решение готовить испытуемый раствор в самом флаконе, без нарушения герметизации.

Для растворения большинства подобных препаратов удобно использовать диметилсульфоксид. Это вещество легкодоступно, имеется в продаже необходимой чистоты с содержанием воды менее 0.1 %, а при необ-

ходимости, легко может быть высушено и очищено от сопутствующих примесей [3]. Диметилсульфоксид хорошо растворяет практически все биологически активные вещества, в том числе многие органические вещества, которые могут быть использованы в качестве внутренних стандартов. В данном случае в качестве внутреннего стандарта был выбран метанол, хроматографическая зона которого полностью отделяется от хроматографической зоны воды при хроматографировании практически на всех типах сорбентов [4, 5]. Дозирование и введение раствора внутреннего стандарта во флакон препарата осуществляли шприцем вместимостью 250 мкл (производство фирмы «Hamilton»), прокалывая резиновую пробку флакона. Для повышения воспроизводимости объема вводимого во флаконы раствора внутреннего стандарта шприц был оснащен приспособлением Чани, которое ограничивает ход плунжера шприца [6, 7, 8]. При аккуратном использовании шприц, оснащенный приспособлением Чани, позволяет дозировать объем в 250 мкл с относительным стандартным отклонением менее 0.1 %.

Экспериментальная часть

Приготовление раствора внутреннего стандарта

Концентрация внутреннего стандарта в приготовленном растворе должна быть такой, чтобы площади пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта были по возможности близки. Принимая во внимание отличие в чувствительности термоконтдуктометрического детектора (катарометра) по отношению к воде и к метанолу [9], а также объем раствора, необходимый для полного растворения препарата в одном флаконе, можно рассчитать, что концентрация метанола в растворе должна быть около 6 мг/мл. Для приготовления такого раствора 0.2 мл метанола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемых растворов

В 5 флаконов с лиофилизированной массой, прокалывая резиновую пробку шприцем вместимостью 250 мкл, оснащенным устройством Чани, вводят по 200 мкл раствора внутреннего стандарта и осторожно перемешивая, чтобы раствор не попал на резиновую пробку, растворяют содержимое флаконов. Далее другим, чистым и сухим шприцем вме-

стимостью 1 мл, из флаконов извлекают полученные растворы, объединяя их непосредственно в используемом шприце. При этом для предотвращения попадания атмосферной воды в испытуемый раствор через иглу шприца, иглу предварительно пропускают через резиновую мембрану от испарителя газового хроматографа и каждый раз после извлечения иглы из флакона закрывают конец иглы резиновой мембраной [10]. Объединенный раствор помещают в сосуд автоинжектора вместимостью 1.1 мл и используют для анализа.

В случае необходимости определения воды в каждом флаконе, например для установления однородности процесса лиофилизации, испытуемый раствор из каждого флакона может быть перенесен в сосуд автоинжектора вместимостью 200 мкл и проанализирован отдельно.

Приготовление растворов сравнения воды

Концентрация воды в диметилсульфоксиде, используемом для приготовления испытуемых растворов и растворов сравнения, как правило, неизвестна. Поэтому для получения достоверных результатов калибровку газового хроматографа предлагаем проводить по 5 растворам с концентрацией воды 2 мг/мл, 4 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл и 10 мг/мл, что перекрывает весь возможный диапазон содержания воды в препаратах. Промежуточные и используемые для калибровки хроматографа растворы воды готовят из исходного раствора воды.

Приготовление исходного раствора воды

5.0 г (точная навеска) воды помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в диметилсульфоксиде, доводят объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. Концентрация воды в исходном растворе 200 мг/мл.

Приготовление промежуточных растворов 1, 2, 3, и 4 воды

По 1.0 мл, 2.0 мл, 3.0 мл, 4.0 мл исходного раствора воды в диметилсульфоксиде помещают, соответственно, в 4 мерные колбы вместимостью 5 мл, доводят объёмы растворов раствором диметилсульфоксида до метки и перемешивают. Концентрация воды в полученных растворах составляет 40 мг/мл, 80 мг/мл, 120 мг/мл, и 160 мг/мл, соответственно.

Приготовление стандартных образцов (СО) воды

В 4 герметично закрываемых сосуда вместимостью 2 мл, с помощью микрошприца,

оснащенного приспособлением Чани, помещают по 50 мкл промежуточных растворов 1, 2, 3 и 4 воды, соответственно, а в 5-й сосуд помещают 50 мкл исходного раствора воды. В каждый сосуд прибавляют по 1.0 мл раствора внутреннего стандарта и перемешивают. Концентрация воды в приготовленных растворах воды составляет 2 мг/мл, 4 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл и 10 мг/мл, соответственно, т.е. соответствует концентрации воды в препарате от 4 % до 20 %, что перекрывает весь диапазон реально встречающихся концентраций воды в лиофилизированных препаратах.

Хроматографирование

Методика была разработана и опробована на газовом хроматографе модели GC-14B, оснащенном устройством автоматического ввода проб АОС-14 и компьютеризированным интегратором C-R7a, производства фирмы «Шимадзу», Япония.

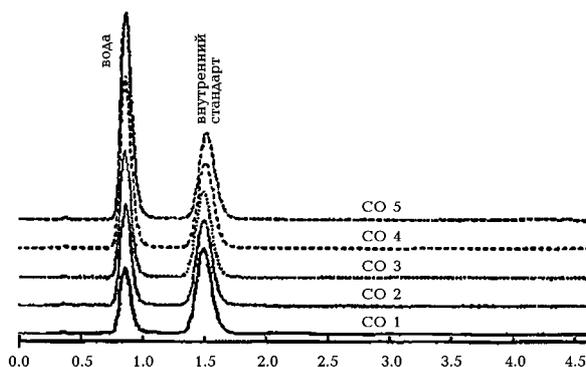
Даже на коротких колонках с полимерными сорбентами пики воды и метанола разделяются практически полностью. Единственное осложнение, возникающее при хроматографировании растворов воды и метанола в диметилсульфоксиде в изотермических условиях, заключается в значительном (около 50 мин) времени удерживания самого растворителя при температурах колонки, обеспечивающих полное разделение пиков воды и метанола. Поэтому для данного случая был выбран режим программирования температуры термостата колонки. На первой температурной ступени при температуре 160 °С в изотермическом режиме в течение 3 мин происходит разделение хроматографических зон воды и метанола, а затем температуру колонки для быстрого удаления растворителя из колонки повышают до температуры 220 °С.

Программирование температуры колонок при использовании термокондуктометрического детектора (катарометр) возможно только на приборах с достаточно хорошей термоизоляцией детектора от самого термостата. В хроматографе типа GC-14B, катарометр имеет отдельный от других детекторов термостат, причем газовый поток из колонки вначале проходит через отдельно термостатируемый блок других детекторов, а затем поступает в термостатируемый блок катарометра. Такое двойное термостатирование позволяет исключить влияние изменения температуры термостата колонок на сигнал детектора.

Хроматографирование проводят в следующих условиях:

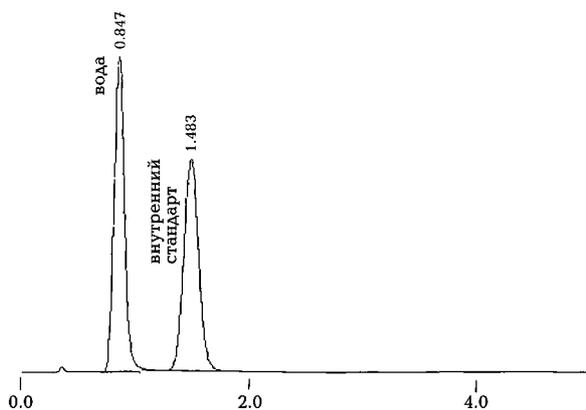
- колонка стеклянная, размером (110 × 0.3) см;
- сорбент Витопол Б (сополимер стирола и дивинилбензола) с размером частиц 0.18 – 0.20 мм;
- температура испарителя 220 °С;
- температура блоков детекторов 200 °С;
- температура термостата катарометра 200 °С;
- температуру колонки программируют: начальную температуру 160 °С выдерживают в течение 3 мин; прирост температуры со скоростью 15 °С/мин до температуры 220 °С/мин, температуру 220 °С выдерживают в течение 6 мин.
- газ-носитель гелий, водород;
- скорость газа-носителя 28 мл/мин;
- детектор термокондуктометрический (катарометр);
- ток накала – 120 мА

Рисунок 1



Хроматограммы растворов 1 – 5 СО воды (пик растворителя не показан)

Рисунок 2



Типичная хроматограмма испытуемого раствора препарата «Винкрестин, порошок лиофилизированный для инъекций», полученная в условиях количественного определения воды (пик растворителя не показан)

Хроматографируют поочередно по 1 мкл испытуемого раствора и растворов 1 – 5 СО воды, получая 5 хроматограмм испытуемого раствора и по 2 хроматограммы растворов 1 – 5 СО воды.

Типичные хроматограммы растворов 1-5 СО воды, а также испытуемого раствора препарата приведены на Рис. 1 и Рис. 2.

Время получения одной хроматограммы составляет около 15 мин, а полный цикл измерений, включая калибровку прибора, можно провести за 4 ч. Параметры калибровки прибора, если не менять установок скорости потока газа-носителя, сохраняются в течение недели, что позволяет каждый раз не тратить время на калибровку прибора, при этом проводить измерения концентрации воды в препаратах за время, равное около 1.5 часа.

Расчет результатов

Содержание воды в лиофилизированном препарате (X), в процентах, вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{(B_1 - a) \cdot 0.2 \cdot 5 \cdot 100}{b \cdot m_s \cdot 5} = \frac{(B_1 - a) \cdot 20}{b \cdot m_s},$$

где

B_i – среднее значение отношения площадей пиков воды к площадям пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

m_s – средняя масса содержимого флакона, в миллиграммах;

a и b – коэффициенты, вычисленные методом наименьших квадратов [11] из хроматограмм растворов 1 – 5 СО воды по формулам:

$$b = \frac{10 \sum_{i=1}^{i=10} C_i \cdot B_i - \sum_{i=1}^{i=10} C_i \cdot \sum_{i=1}^{i=10} B_i}{10 \cdot \sum_{i=1}^{i=10} C_i^2 - (\sum_{i=1}^{i=10} C_i)^2}$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^{i=10} B_i - b \cdot \sum_{i=1}^{i=10} C_i}{10}$$

где:

B_i – среднее значение отношения площадей пиков воды к площадям пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм растворов 1 – 5 СО воды (2 хроматограммы каждого раствора);

C_i — содержание добавленной воды в растворах 1 — 5 СО воды, в миллиграммах в 1 мл;

10 — количество измерений растворов 1, 2, 3, 4 и 5 СО воды.

Содержание воды в растворах 1 — 5 СО воды (C_i), в миллиграммах в 1 мл, вычисляют по формуле:

$$C_i = \frac{m_0 \cdot 0.05 \cdot 1000 \cdot V_i}{25 \cdot 5} = m_0 \cdot V_i \cdot 0.2,$$

где:

m_0 — масса навески воды, в граммах, взятая для приготовления исходного раствора;

V_i — объём исходного раствора, взятый для приготовления промежуточных растворов 1 — 4 воды. Для раствора 5 СО воды значение V_i принимают 5 мл.

Метрологические характеристики методики

Метрологические характеристики методики во многом определяются качеством калибровки используемой мерной посуды, качеством шприцев, с помощью которых проводят дозирование раствора внутреннего стандарта, а также стабильностью работы хроматографа, автоинжектора и правильностью выбора параметров обработки хроматограмм. В связи с этим теоретический расчет неопределенности получаемых результатов по предложенной методике затруднен. Поэтому метрологические характеристики методики были оценены методом «введено-найдено». В качестве вещества - стандарта, содержащего воду, был выбран лактозы моногидрат, качество которого соответствовало требованиям статьи «Lactose-Monohydrat» Фармакопеи Германии 10 изд. с содержанием воды 5.06 % (метод К. Фишера). При выполнении измерений хроматографическая система имела следующие параметры:

— эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику воды, соответствовала 500 теоретическим тарелкам;

— коэффициент разделения пиков воды и внутреннего стандарта — более 2.

Приготовление испытуемых образцов стандартного вещества проводили по следующей методике. Навески лактозы моногидрата массой 10 — 11 мг, взвешенные на весах, с погрешностью взвешивания ± 1 мкг, помещали в 5 флаконов вместимостью 10 мл. Флаконы герметизировали резиновыми пробками с обжимными алюминиевыми колпачками и проводили определение воды по описанной выше методике. Суммарная навеска лактозы моногидрата, помещенная в 5 флаконов, составляла 53.5620 мг, что соответствовало 2.7102 мг воды.

Рисунок 3

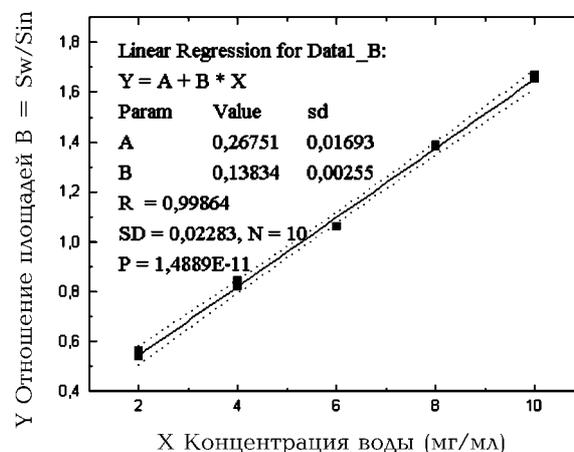


График и параметры линейной зависимости отношения площадей пиков воды к площадям пиков внутреннего стандарта

Калибровочный график и параметры зависимости отношения площадей пиков воды к площадям пиков внутреннего стандарта, определенные по результатам хроматографирования растворов 1- 5 СО воды представлены на Рис. 3, а результаты определения воды в стандартных образцах лактозы моногидрата с метрологическими характеристиками представлены в Таблице.

Таблица

Метрологические характеристики методики количественного определения воды в препарате «Винкристин, порошок лиофилизированный для инъекций»

μ %	f	X_i	X_{cp}	S^2	S	P	t (P,f)	ΔX	ϵ , %
		5.053							
		5.083							
5.06	4	5.064	5.067	0.00034	0.0184	95	2.776	0.051	1.01
		5.048							
		5.090							

Как видно из представленных данных, результаты количественного определения воды не отягощены систематической ошибкой, и методика позволяет проводить количественное определение воды в препарате «Винкристин, порошок лиофилизированный для инъекций» с относительным стандартным отклонением около 1 %, что полностью соответствует требованиям к метрологическим характеристикам методик предельных тестов.

Данная методика была также использована для определения воды в ряде лиофилизированных препаратов при отработке режимов лиофильной сушки.

Выводы

1. Разработана методика (метод ГХ) количественного определения остаточных количеств воды в лиофилизированных препаратах, в частности в препарате «Винкристин, порошок лиофилизированный для инъекций», позволяющая получать достоверные результаты.

2. Приготовление испытуемых растворов предложено проводить во флаконах с препаратом, без вскрытия флакона. Методика позволяет значительно сократить время анализа.

3. Методика позволяет количественно определять содержание воды в одном флаконе, что может быть использовано при отработке режимов лиофильной сушки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Технология и стандартизация лекарств: Сб. науч. тр. / Под ред. В.П. Георгиевского, Ф.А. Конева. — Харьков: РИРЕГ, 2000. — Т. 1, 2.
2. Чуешов В.И., Чернов Н.Е., Хохлова Л.Н. Промышленная технология лекарств. — Харьков: Основа, 1999. — Т. 1, 2.
3. Беккер Г., Бергер В., Домшке Г. Органикум. - М.: Мир, 1979. - Т. 2. — 444 с.
4. Лурье А.А. Хроматографические материалы. — М.: Химия, 1978. — 438 с.
5. Король А.Н. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии. — М.: Химия, 1985. — 240 с.

6. Берчфильд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии — М.: Мир, 1964. — 619 с.
7. Кэц Э. Количественный анализ хроматографическими методами. — М.: Мир, 1990 - 320 с.
8. Лейбница Э., Штруппе Х.Г. — Руководство по газовой хроматографии. — М.: Мир, 1988. - Т 1, 2.
9. Коцев Н., Пецев Н. Наръчник по газова хроматография. - София, Университетско изд. «Св. Клемент Орхидски», 1994. - 439 с.
10. Иванова Н.Т., Франгулян Л.А. Газохроматографический анализ нестабильных и реакционноспособных соединений. — М.: Химия, 1979. - 232 с.
11. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11 изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.

Резюме

Зинченко О.А., Котова Е.Е., Чибіляев Т.Х.

Визначення залишкових кількостей води в ліофілізованих лікарських препаратах методом газової хроматографії

Розроблено методику кількісного визначення залишкових кількостей води в ліофілізованих препаратах методом газової хроматографії (ГХ). Методика дозволяє визначити вміст води в діапазоні до 15 % при масі вмісту флакона від 10 мг. Визначення проводять без розкриття флакона, що дозволяє знизити похибку визначення.

Summary

Zinchenko A.A., Kotova E.E., Chibilyaev T.H.

Determination of residual water in lyophilized medicinal products by a gas chromatography method

The procedure of quantitative determination of residual water in lyophilized medicinal products by a gas chromatography (GC) method has been developed. The procedure makes it possible to determine residual water content in the range up to 15 %, when the weight of vial content ? 10 mg. The determination is performed without vial opening that allows the determination error to be reduced.

Зинченко Александр Анатольевич (р. 1956). Окончил Харьковский университет (1983). Ст. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ.

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

Чибіляев Тимур Хайдарович. К.фарм.н. Зам. директора по развитию ЗАО «Верофарм», г. Москва.

УДК 615.244:547.466].07

Харченко О.В., Шеин А.Т., Морозюк А.В.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Контроль качества препаратов на основе L-аргинина L-глутамата

Разработаны показатели качества препаратов: Глутаргин, таблетки 0.25 г, Глутаргин, раствор для инъекций 4 % и Глутаргин, концентрат для инфузий 40 %. Эти показатели включены в аналитическую нормативную документацию на перечисленные лекарственные формы. Препараты серийно выпускаются ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»»

В настоящее время вопрос разработки препаратов для лечения заболеваний печени очень актуален. К таким препаратам относится препарат Глутаргин, в основу которого легла синтезированная в секторе химии и технологии комбинированных препаратов лаборатории физической химии ГП ГНЦЛС субстанция L-аргинина L-глутамат.

Целью настоящей работы является разработка методов анализа полученной субстанции и методов контроля качества препаратов на ее основе.

L-Аргинина L-глутамат {(S)-2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты (S)-2-аминоглутарат} был синтезирован в ГП ГНЦЛС по оригинальной технологии [1] и представляет собой соль двух аминокислот: L-аргинина и кислоты L-глутаминовой. Структурная формула приведена ниже.



На основе L-аргинина L-глутамата ГП ГНЦЛС и ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»» разработаны препараты: Глутаргин, таблетки 0.25 г, Глутаргин, раствор для инъекций 4 % и Глутаргин, концентрат для инфузий 40 %.

Разработанные препараты обладают гипотоническим и гепатопротекторным действием, применяются при гепатитах различной этиологии, включая вирусный гепатит, циррозе печени, отравлениях гепатотропными ядами, состоянии гипераммониемии и крайних ее формах проявления — печеночной энцефалопатии, прекоме и коме, лептоспирозе, в том числе и при тяжелых формах с острой печеночной недостаточностью.

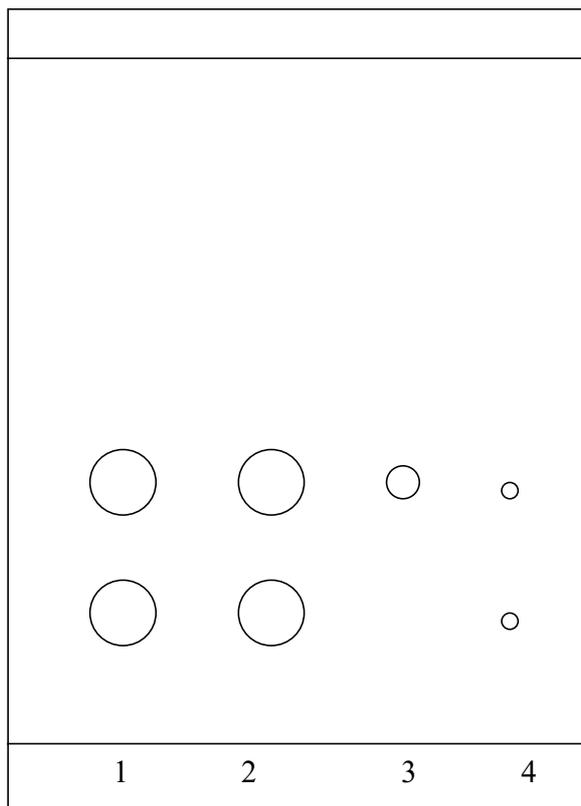
Для контроля качества выпускаемых препаратов ГП ГНЦЛС и ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»» разработали аналитическую нормативную документацию

(АНД). В проекты АНД на Глутаргин, раствор для инъекций 4 % и Глутаргин, концентрат для инфузий 40 % введены следующие показатели: описание, идентификация, прозрачность, цветность, рН, вещества, обнаруживаемые нингидрином, номинальный объем, стерильность, пирогенность, токсичность, механические включения, количественное определение. В проект АНД на Глутаргин, таблетки 0.25 введены следующие показатели: описание, подлинность, средняя масса, распадаемость, вещества, обнаруживаемые нингидрином, растворение, микробиологическая чистота и количественное определение.

Для определения посторонних примесей — веществ, обнаруживаемых нингидрином, во всех трех лекарственных формах применяют метод ТСХ с использованием пластинок Сорбфил ПТСХ-П-А или Кизельгель 60. Нами были апробированы подвижные фазы (ПФ), рекомендуемые в ГФУ [2] и зарубежных Фармакопеях [3, 4, 5] для контроля посторонних примесей в аргинине гидрохлориде и кислоте глутаминовой. Были исследованы ПФ следующего состава: раствор аммиака концентрированный - изопропанол (3:7); кислота уксусная ледяная — вода - н-бутанол (1:1:3); кислота уксусная ледяная — вода - н-бутанол (1:1:2). Было установлено, что наибольшее ΔR_f между пятнами аргинина и кислоты глутаминовой (Рис. 1) наблюдается при использовании ПФ состава: кислота уксусная ледяная — вода - н-бутанол (1:1:3).

Для количественного определения аминокислот по данным, представленным в литературе [2, 3, 4, 5, 6], чаще всего используется метод неводного титрования. В разделе «Количественное определение» определение L-аргинина L-глутамата в таблетках, растворе для инъекций и концентрате для инфузий проводят потенциометрическим титрованием 0.1 М раствором кислоты хлорной в среде уксусной и муравьиной кислот, предварительно упаривая раствор для инъекций и инфузий до сухого остатка.

Рисунок 1



Хроматограмма, полученная при определении посторонних примесей в препарате Глутаргин, таблетки 0.25 г

- 1 – раствор препарата;
- 2 – раствор СО L-аргинина L-глутамата;
- 3 – раствор СО кислоты глутаминовой (для контроля примесей);
- 4 – раствор для проверки пригодности хроматографической системы

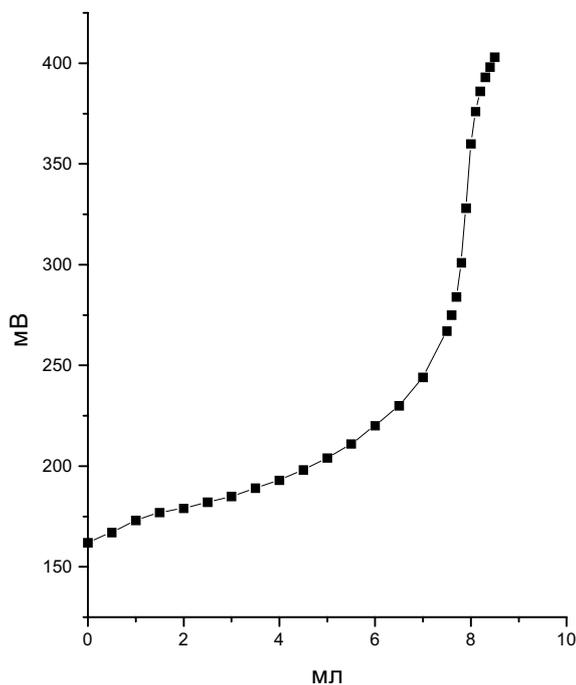
Кривая титрования представлена на Рис. 2.

1 мл 0.1 М раствора кислоты хлорной соответствует 0.01071 г $C_{11}H_{23}N_5O_6$. Так как титруются три аминокислотные группы: две - в аргинине, одна - в кислоте глутаминовой, эквивалент аргинина глутамата равен 1/3 молекулярной массы вещества.

Результаты количественного определения аргинина глутамата были обработаны методом математической статистики. Относительная ошибка определения составляет около $\pm 0.9\%$.

В тесте «Растворение» для препарата Глутаргин, таблетки 0.25 г для получения достоверных результатов при титриметрическом методе анализа (титрант — 0.1 М раствор кислоты хлорной) необходимо использование значительного количества таблеток (не менее

Рисунок 2



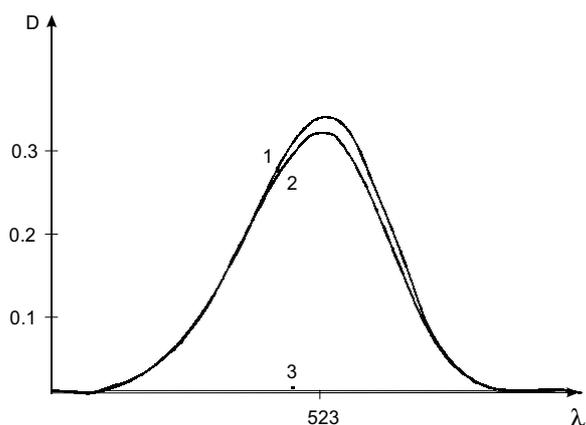
Кривая потенциметрического титрования L-аргинина L-глутамата

8 при объеме среды растворения 400 мл). Перед титрованием испытуемый водный раствор (объем примерно 5-10 мл) должен быть упарен под вакуумом, что увеличивает продолжительность анализа. L-аргинин L-глутамат представляет собой соль двух аминокислот, каждая из которых, как нами было установлено, дает окрашенное соединение с аллоксаном гидратом. Максимум поглощения этого соединения и для аргинина, и для кислоты глутаминой определяют при длине волны 523 нм (Рис. 3). В тесте «Растворение» был использован метод анализа, основанный на образовании окрашенного соединения между аминокислотой и аллоксаном гидратом (мезоксазолилмочевинной), которое обладает достаточной устойчивостью в диметилформамиде [7, 8].

В качестве раствора сравнения используют раствор аргинина глутамата. Концентрация аргинина глутамата в спектрофотометрируемых растворах составляет около 0.001%. Зависимость оптической плотности растворов от концентрации L-аргинина L-глутамата — линейная. Она сохраняется до концентрации около 0.0013%.

В качестве компенсационного раствора нами были апробированы диметилформамид

Рисунок 3



Спектры поглощения окрашенного соединения аргинина глутамата с алоксана гидратом

- 1 – раствор сравнения;
2 – испытуемый раствор;
3 – плацебо.

и компенсационный раствор, приготовленный аналогично испытуемому раствору: 10 мл воды доводили до объема 25 мл диметилформамидом. Для анализа использовали 1 мл полученного раствора. Результаты определения показали, что оптическая плотность приготовленного таким образом раствора, по сравнению с оптической плотностью диметилформамида, равна 0. Поэтому в проекте АНД предложено в качестве компенсационного раствора использовать диметилформамид.

Разработанные АНД на три лекарственных формы утверждены, препараты выпускаются ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»».

Вывод

В результате проведенных исследований разработаны методы анализа субстанции L-аргинина L-глутамат и методы контроля качества препаратов на ее основе: таблеток, раствора для инъекций и концентрата для инфузий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 54880 А Україна, МКИ А61К31/195, А61К9/00, А61Р1/16, А61Р39/00. (S)-2-аміно-5-гуанідинопентанової кислоти (S)-2-аміноглутарат (L-аргініну L-глутамат), що має гепатопротекторну, гіпоамоніємічну та детоксика-

ючу дію, спосіб його одержання, фармацевтична композиція на його основі. Шеїн А. Т., Георгієвський В. П., Шовковий А. В., Черниш Л. Я., Харченко О. В. та ін. (Україна). – 2003. - Бюлл. № 3 – С. 4.

2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.

3. British Pharmacopoeia, 2002. - Grown Copyright, 2002. - On – Line Version.

4. Deutsches Arzneibuch. - 1999.

5. United States Pharmacopoeia, 24 ed/ – NF19. - Supplement Two – The United States Pharmacopoeias Convention Inc, 2000. – On – Line Version.

6. European Pharmacopoeia, 4th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 1997 (Suppl. 2002). – On – Line Version.

7. Петренко В.В. Применение аллоксана для количественного определения лекарственных веществ из класса аминокислот // Тезисы докл. 3-го Всесоюзного съезда фармацевтов. - Кишинев, 1980. - С. 253.

8. Петренко В.В. Уніфікація методики кількісного визначення глутамінової кислоти та метіоніну в лікарських формах // Фармац. журн. – 1983. - № 4. - С. 36-38.

Резюме

Харченко О.В., Шеїн А.Т., Морозюк А.В.

Контроль якості препаратів на основі L-аргініну L-глутамату

Розроблені показники якості препаратів: Глутаргін, таблетки 0.25 г, Глутаргін, розчин для ін'єкцій 4 % і Глутаргін, концентрат для інфузій 40 %. Ці показники включено до аналітичної нормативної документації на перелічені лікарські форми. Препарати серійно випускаються ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»».

Summary

Kharchenko O.V., Shein A.T., Morozjuk A.V.

Quality control of preparations on a basis of L-arginine L-glutamate

The quality indices were worked up for preparations: Glutargin, tablets 0.25 g, Glutargin, injection solution 4 %, and Glutargin, infusion concentrate, 40 %. These indices were included in analytic normative documentation on enumerated drug dosage forms. The preparations are produced serially by «Pharmaceutical company «Zdorovye», Ltd.

Харченко Ольга Валеріївна. Окончила Харківський державний університет ім. Каразина (1996). Мл. науч. сотр. лабораторії фізико-хімічних процесів (ЛФХП) ГП ГНЦЛС.

Шеїн Анатолій Тихонович (р.1946). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1970). Зав. сектором химии и технологии комбинированных препаратов ГП ГНЦЛС.

Морозюк Анжела Владимировна. Окончила в 1993 г. Харьковскую фармацевтическую академию (1993). Науч. сотр. лабораторії фізико-хімічних процесів ГП ГНЦЛС.

Фітохімічні дослідження

УДК 615.322:582.623.2

Бородіна Н.В., Ковальов В.М.
Національний фармацевтичний університет**Кількісне визначення фенольних сполук *Populus tremula L.***

Представлено результати кількісного визначення основних груп діючих речовин фенольної природи (оксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин) у листі, корі *Populus tremula L.*, а також в екстрактах, одержаних із цієї сировини.

Фенольні сполуки широко розповсюджені у рослинному світі. Вони відіграють важливу фізіологічну роль у рослинах, беруть участь в окиснювально-відновних процесах, диханні.

Увагу дослідників фенольні сполуки привертають як біологічно активні речовини, які зумовлюють фармакологічну активність великої кількості лікарських форм на основі рослинної сировини [4, 13].

Незважаючи на широке розповсюдження фенольних сполук у рослинному світі, для одержання фітопрепаратів використовують обмежену кількість лікарських рослин. Це пояснюється браком відомостей про хімічний склад, сировинну базу рослин, що накопичують фенольні сполуки.

Тополя тремтяча (*Populus tremula L.*) або осика родини вербові (*Salicaceae*) є однією з рослин, для якої характерний високий вміст речовин фенольної природи [12, 13]. Осика здавна використовується у народній медицині при лихоманці, малярії, при хронічному бронхіті, туберкульозі легенів, гастриті, проносі, захворюваннях печінки, жовчних шляхів та селезінки [1].

Раніше на кафедрі фармакогнозії НФаУ було проведено фітохімічне дослідження вегетативних та генеративних органів *Populus tremula L.* На підставі якісних реакцій, тонкошарової та паперової хроматографії за флуоресценцією у фільтрованому УФ-світлі та за величинами R_f було визначено наявність флавоноїдів, фенологікозидів, кумаринів, дубильних речовин та оксикоричних кислот [10, 11]. Комплекси фенольних сполук, одержані з листя та кори осики, в експерименті виявили протизапальну, анальгетичну, діуретичну, антиоксидантну, антиексудативну активність та мали низьку токсичність [2, 3, 7, 9].

Метою нашого дослідження стало вивчення вмісту фенольних сполук у корі, листі *Populus tremula L.* та деяких екстрактах, одержаних із цієї сировини.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були зразки листя та кори *Populus tremula L.*, заготовлені у 2002-2003 роках у Харківській області (кора - навесні на початку сокоруху, листя — влітку); водний екстракт кори осики; водно-спиртові екстракти кори та листя осики.

Повітряно-суху сировину подрібнювали до розміру часток 1 мм. Вологість сировини визначали за загальноприйнятою методикою [5]. Для одержання комплексу фенольних сполук сировину попередньо вичерпно екстрагували хлороформом в апараті Сосклетта для очищення від ліпофільних речовин. Знежирену сировину сушили до видалення залишку хлороформу і вичерпно екстрагували у колбі з відповідним екстрагентом (гаряча вода або 70 % спирт) у співвідношенні сировина — екстрагент 1:10, при нагріванні на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Одержані екстракти об'єднували, випарювали у вакуумі до повного видалення розчинників та одержання сухих екстрактів.

Аналіз біологічно активних речовин проводили за допомогою фармакопейних методів [5, 6] а також із використанням паперової хроматографії.

Визначення вмісту оксикоричних кислот у досліджуваній сировині проводили спектрофотометричним методом за методикою ТФС 429-6/37-232-96 на траву злиски канадської. Оптичну густину розчинів вимірювали за довжини хвилі 327 нм у кюветах із товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі СФ-46.

Вміст суми оксикоричних кислот, у перерахунку на хлорогенову кислоту, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot 200 \cdot 50 \cdot 100}{E_{1cm}^{1\%} \cdot a_1 \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

де:

D_1 – оптична густина випробовуваного розчину;
 a_1 – маса наважки сировини, г;
 $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання хлорогенової кислоти (531);
 W – втрата в масі при висушуванні, %.

Для аналізу суми флавоноїдів застосовували спектрофотометричний метод із використанням реакції комплексоутворення флавоноїдів із алюмінію хлоридом [6]. Як стандартний зразок використовували ДСЗ рутину. Оптичну густина розчинів вимірювали за довжини хвилі 410 нм у кюветах із товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі СФ-46.

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot (100 - W)} =$$

$$= \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 2500}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

де:

D – оптична густина випробовуваного розчину;
 D_0 – оптична густина розчину ДСЗ рутину;

m – маса наважки сировини, г;
 m_0 – маса наважки ДСЗ рутину, г;
 W – втрата в масі при висушуванні, %.

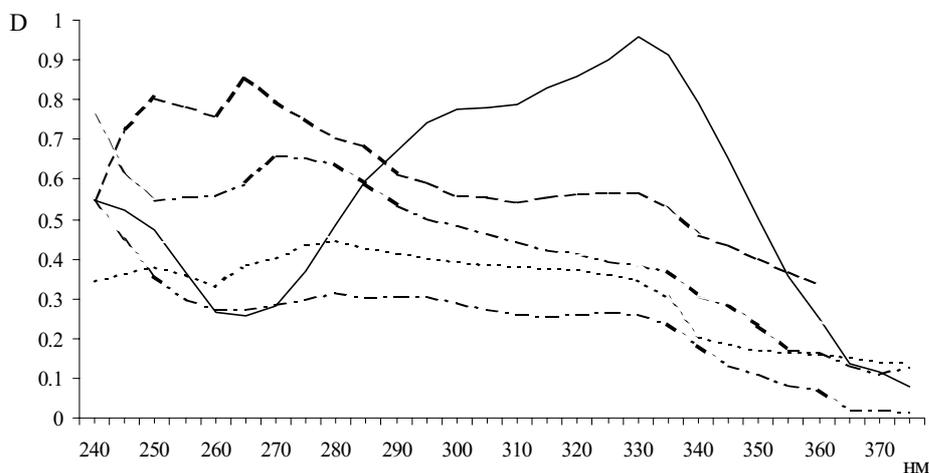
Кількісний аналіз суми дубильних речовин проводили фармакопейним і комплексометричним методом [5, 15].

Результати досліджень та їх обговорення

Із листя та кори *Populus tremula* L. за наведеною вище методикою були одержані сухі екстракти, як екстрагенти використовували воду та 70 % спирт. Вихід екстрактів склав: при водній екстракції кори – 11 %, при екстракції кори 70 % спиртом – 12 %, при екстракції листя 70 % спиртом – 28 %. Одержані екстракти являють собою гігроскопічні порошки від світло- до темно-брунатного кольору, гіркуваті на смак, зі слабким своєрідним запахом, розчинні у воді та спирті, не розчинні у хлороформі.

Якісними реакціями та хроматографічним аналізом було визначено, що в корі та листі осики містяться оксикоричні кислоти. УФ-спектри розчинів екстрактів осики та хлорогенової кислоти наведені на Рисунку. В УФ-спектрах випробовуваних об'єктів відмічається максимум поглинання в межах 325-330 нм, що дозволило використати хлоро-

Рисунок



— УФ-спектр розчину хлорогенової кислоти
 - - - - - УФ-спектр екстракту листя осики (20 % спирт)
 ······ УФ-спектр екстракту кори осики (20 % спирт)
 - · - · - · УФ-спектр водного екстракту кори осики
 - · - · - · УФ-спектр екстракту кори осики (70 % спирт)
 — УФ-спектр екстракту листя осики (70 % спирт)

УФ-спектри екстрактів листя та кори осики та розчину хлорогенової кислоти

Таблиця

Кількісний вміст фенольних сполук в листі, корі та екстрактах листя та кори осики

Досліджуєми́й об'єкт	Оксикоричні кислоти	Флавоноїди	Дубільні речовини (перманганатометричний метод)	Дубільні речовини (комплексометричний метод)
кора осики	2.07 ± 0.02	0.14 ± 0.05	9.72 ± 0.27	5.17 ± 0.02
листя осики	2.85 ± 0.09	1.91 ± 0.02	7.45 ± 0.12	3.38 ± 0.02
водний екстракт кори осики	5.17 ± 0.10	1.37 ± 0.01	10.62 ± 0.11	
екстракт кори осики (70 % спирт)	4.50 ± 0.06	1.88 ± 0.03	8.51 ± 0.02	
екстракт листя осики (70 % спирт)	9.52 ± 0.23	3.79 ± 0.03	11.41 ± 0.03	

генову кислоту в якості стандартного зразка. Результати досліджень зі встановлення вмісту оксикоричних кислот, у перерахунку на хлорогенову кислоту, у корі, листі та екстрактах осики наведені в Таблиці. Дані свідчать про значний вміст оксикоричних кислот у сировині та екстрактах *Populus tremula* L., якій склав: у листі – 2.85 %, у корі – 2.07 %, при водній екстракції кори – 5.17 %, при екстракції кори 70 % спиртом – 4.50 %, при екстракції листя 70 % спиртом – 9.52 %. Найбільший вміст цих сполук в екстракті з листя осики.

Методом двомірної хроматографії на папері в системах н-бутанол - кислота оцтова - вода (4:1:2) і 15 % кислота оцтова, якісними реакціями зі специфічними реактивами, за флуоресценцією в УФ-світлі в екстрактах із кори та листя осики було визначено від 29 до 36 речовин фенольної природи. 7 речовин за хроматографічною рухливістю, забарвленням в УФ-світлі віднесені до флавонолових глікозидів, 4 - до флавоноїдних агліконів, 6 - до фенольних глікозидів, 9 - до похідних оксикоричних кислот, 3 - до похідних галової кислоти. У досліджуваних об'єктах ідентифікований рутин, тому був проведений кількісний аналіз вмісту суми флавоноїдів, у перерахунку на рутин. Результати досліджень наведені в Таблиці. Вміст флавоноїдів, у перерахунку на рутин, склав: у корі – 0.14 %, листі – 1.91 %; при екстракції листя 70 % спиртом – 3.79 %, при водній екстракції кори та екстракції кори 70 % спиртом – 1.37 % та 1.88 %, відповідно. За даними, наведеними в Таблиці, найбільша кількість флавоноїдів накопичується у листі осики.

На основі якісних реакцій та хроматографічного аналізу було визначено, що листя та кора осики містять значну кількість дубільних речовин, що гідролізуються. Це дозволило нам провести кількісний аналіз суми дубільних речовин фармакопейним і комплексометричним методом.

Фармакопейний метод заснований на окисненні дубільних речовин перманганатом калію. Результати визначення кількісного вмісту дубільних речовин перманганатометричним методом наведені в Таблиці. Аналіз даних, поданих у таблиці, показав, що найбільшу їх кількість містить екстракт листя осики (70 % спирт) (11.41 %). Однак, цим методом визначається не тільки вміст власно дубільних речовин, але й усіх окиснювальних сполук: простих фенолів, фенолкарбонових кислот та інших поліфенолів. Тому було проведено кількісне визначення дубільних речовин у сировині комплексометричним методом, який, на відміну від перманганатометричного методу, дозволяє виключити вплив на результати аналізу супутніх таніну інших фенольних сполук. Метод комплексометричного титрування заснований на осадженні дубільних речовин аміачним розчином цинку оксиду, видаленні осаду центрифугуванням, руйнуванні комплексу цинк – дубильна речовина мінеральною кислотою та титруванні катіонів цинку розчином натрію едетату у присутності індикатора ксиленового оранжевого. Результати комплексометричного визначення дубільних речовин наведені в Таблиці та дають певну уяву про їх вміст у листі та корі *Populus tremula* L. (3.38 % і 5.17 %, відповідно).

Висновки

Вперше проведено кількісне визначення основних груп діючих речовин фенольної природи в корі, листі та екстрактах осики: дубільних речовин, оксикоричних кислот, флавоноїдів. Тополя тремтяча має великий практичний інтерес як джерело для одержання фітопрепаратів різнобічної фармакологічної дії за рахунок вмісту значної кількості фенольних сполук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болтарович З.Е. Народна медицина українців. - К.: Наук. думка, 1990. – 230 с.

2. Волковой В.А., Деркач Н.В. Антиоксидантная активность водного экстракта коры осины // Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія: Тез. доп. III Міжнар. наук.-практ. конф. — Харків: Вид-во НФаУ, 2003. — С. 69.
3. Волковой В.А., Деркач Н.В., Бородин Н.В. Исследование антиэкссудативной активности экстракта коры осины // Тез. докл. IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — М., 2002. — С. 595.
4. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука, Сиб. отд.-ние, 1990. — 333 с.
5. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
6. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырьё / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
7. Деркач Н.В., Решетняк Н.В. Волковой В.А. Определение острой токсичности и эффективной дозы биологически активных веществ коры осины // Лекарства — человеку: Мат. науч.-практ. конф. — Харьков, 2002. — Т. XVII, № 2. — С. 85-87.
8. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.А. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. — СПб., 2001. — С. 510-512.
9. Изучение некоторых видов биологической активности экстрактов из листьев и коры осины / Воронина Л.Н., Набока О.И., Бородин Н.В. и др. // Лекарства — человеку: Мат. науч.-практ. конф. — Харьков, 2001. — Т. XV, № 1-2. — С. 122-125.
10. Ковальов В.М., Бородин Н.В. Тополя тремтяча — нове джерело отримання фенольних сполук // Вчені України — вітчизняній фармації: Мат. наук.-практ. конф. — Харків: Вид-во НФаУ, 2000. — С. 146-147.
11. Ковальов В.М., Бородин Н.В. Фенольні сполуки кори осики // Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті: Мат. V нац. з'їзду фармацевтів України. — Харків: Вид-во УкрФА, 1999. — С. 303-304.
12. Растительные ресурсы России и сопредельных государств. — СПб.: Мир и семья, 1996. — С. 173.
13. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав и использование; Семейство Raneoniaceae-Thymeliaceae. — Л.: Наука, 1986. — С. 106-113.
14. Сравнительная количественная оценка содержания дубильных веществ у *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. / Хворост О.П., Беликов В.В., Сербин А.Г., Комиссаренко Н.Ф. // Раст. ресурсы. — 1986. — Т. 22. - Вып. 2. — С. 258-262.

Резюме

Бородин Н.В., Ковалев В.Н.

Количественное определение фенольных соединений *Populus tremula* L.

Представлены результаты количественного определения основных групп действующих веществ фенольной природы (оксикоричных кислот, флавоноидов, дубильных веществ) в листьях, коре *Populus tremula* L., а также в экстрактах, полученных из этого сырья.

Summary

Borodina N.V., Kovaliov V.N.

Quantitative determination of *Populus tremula* L. phenolic compounds

Results of quantitative determination of the basic groups of active substances of the phenolic nature (hydroxy-cinnamic acids, flavonoids and tannin) in leaf, bark of *Populus tremula* L. and also in the extracts obtained from this raw material are presented.

Бородин Наталія Валеріївна. Здобувач кафедри фармакогнозії НФаУ.

Ковальов Володимир Миколайович. Д.фарм.н. Професор. Завідувач кафедри фармакогнозії НФаУ.

Готові лікарські засоби

УДК 615.457.014.8

Андрюкова Л.Н.

ГП «Государственный научный центр лекарственных средств»

Первичная упаковка офтальмологических растворов: материалы, используемые для производства контейнеров, и фармацевтическая разработка

Статья посвящена актуальным вопросам современного состояния фармацевтического производства Украины: требованиям к материалам, используемым для производства контейнеров для глазных капель, и необходимости изучения их совместимости с конкретным препаратом при проведении фармацевтической разработки.

Требования к материалам для производства контейнеров, предназначенных для фармацевтической продукции, являются одной из составных частей раздела Европейской Фармакопеи, касающегося первичной упаковки лекарственных средств (ЛС).

В настоящее время при разработке, производстве и контроле предъявляются высокие требования к обеспечению качества лекарственных средств. Одним из факторов, обеспечивающих качество ЛС в процессе хранения, является первичная упаковка и,

прежде всего, материал, из которого изготовлен контейнер. Серьезной комплексной проблемой при выборе материала упаковки является отсутствие взаимодействия между материалом упаковки и лекарственным препаратом, что устанавливается, прежде всего, при проведении фармацевтической разработки. При этом материалы, используемые для изготовления упаковки, должны обеспечивать не только сохранность препарата, но и не изменять свои физико-химические свойства в процессе контакта с лекарственной средой, быть инертными. При выборе упаковочного материала для контейнеров лекарственных средств руководствуются жесткими требованиями, регламентируемыми национальными и международными нормативными документами. Эти требования направлены, прежде всего, на обеспечение основной задачи — не навредить здоровью человека.

Важность и необходимость соблюдения всех требований к упаковке ЛС наглядно можно проследить на примере глазных капель - лекарственной формы с высокими требованиями к составу, условиям производства и применения [1].

В статье [2] рассмотрены основные фармакопейные требования к упаковке глазных капель, типы контейнеров, их достоинства и недостатки, проблемы проведения контроля качества глазных капель в контейнерах из различных материалов.

Цель настоящей работы — на примере упаковочных материалов контейнеров для глазных капель показать актуальность и необходимость изучения в процессе фармацевтической разработки защитного действия упаковки, совместимости ЛС и материалов упаковки как факторов обеспечения качества новых оригинальных препаратов и препаратов-генериков.

Объекты и методы исследования

В данной статье анализ материалов для контейнеров проведен на примере первичной упаковки глазных капель, выпускаемых за рубежом, а также фармацевтическими предприятиями Украины:

1. контейнеров вместимостью 1 мл и 10 мл из полиэтилена низкой плотности (высокого давления) с капельным устройством, получаемым при вскрытии упаковки (ОАО «Концерн Стирол», ОАО «Фармак»);

2. контейнеров вместимостью 5 мл и 10 мл из нейтрального стекла с прилагаемой крышкой-капельницей из полиэтилена высокого

давления в стерильной вакуумной упаковке (ГП «ОЗ ГНЦЛС», ЗАО «Биофарма», ОАО «Фитофарм»).

Результаты и их обсуждение

Ввиду высоких требований к офтальмологическим препаратам [1, 3], в нормативных документах, посвященных упаковке лекарственных средств, особо конкретизируются требования к материалам для контейнеров офтальмологических препаратов [4-8].

К материалу первичной упаковки глазных капель предъявляются следующие общие требования:

— материал упаковки не должен оказывать негативного воздействия на качество препарата, компоненты препарата не должны адсорбироваться на поверхности материала и мигрировать в материал или на поверхность упаковки и, соответственно, в окружающую среду;

— материал упаковки должен служить барьером для жидкостей, водяных паров и газов;

— материал упаковки должен быть непроницаем для микроорганизмов, то есть наряду (совместно) с конструкцией контейнера обеспечивать стерильность препарата;

— материал упаковки должен соответствовать условиям технологического процесса (стерилизация) производства глазных капель.

Для изготовления контейнеров для глазных капель применяют стекло и полимерные материалы - полиэтилен низкой плотности (высокого давления) и полипропилен. Элементы укупорки, согласно [4], являются частью контейнера. Для стеклянных флаконов предусматривается укупорка резиновыми пробками и обкатка металлическими колпачками, капельницами из стекла и резины или капельницами из полимерных материалов, дополнительно сверху закрывающихся крышкой. Последние два вида укупорки встречается все реже из-за частого несоответствия требованиям по воздухопроницаемости и, как следствие, изменения объема содержимого и необходимости постоянного вертикального расположения флакона, а также способности эластомеров, применяемых для изготовления капельниц, адсорбировать различные ПАВ, входящие в состав офтальмологических растворов [9]. Рассмотрим каждый из разрешенных к применению материалов.

По традиции стекло является наиболее часто и давно применяемым материалом для

упаковки глазных капель. Этот вид материала при соответствующей укупорке флакона надежно защищает содержимое упаковки от воздействия внешней среды. Вопросам стабильности препаратов в стеклянной упаковке посвящено большое количество работ, например [10-13]. Необходимо отметить, что в зависимости от состава стекла возможна коррозия поверхности, контактирующей с раствором, что может привести как к изменению внешнего вида раствора (механические частицы), так и к изменению показателей его качества. Остановимся подробнее на требованиях к стеклу как материалу упаковки офтальмологических ЛС.

Стеклянные контейнеры для использования в фармации представляют собой изделия из стекла, предназначенные для непосредственного контактирования с фармацевтическими препаратами [4]. Химическая стабильность стеклянных контейнеров выражается гидролитической стойкостью, т.е. стойкостью к вымыванию растворимых минеральных веществ в воду в предписанных условиях контакта между внутренней поверхностью контейнера и воды. В соответствии с гидролитической стойкостью классифицируют 4 класса стеклянных контейнеров. Для упаковки глазных капель возможно применение стеклянных контейнеров первых двух классов.

Согласно [4], контейнеры из стекла I гидролитического класса (нейтральное стекло) могут применяться для всех препаратов, предназначенных как для парентерального, так и не для парентерального применения, то есть и для глазных капель. Нейтральное стекло представляет собой боросиликатное стекло, содержащее значительные количества оксида бора, алюминия или оксидов щелочных металлов. Благодаря своему составу, боросиликатное стекло характеризуется высокой термической и гидролитической стойкостью.

Учитывая тот факт, что по требованиям к составу и условиям производства глазные капли близки к препаратам для парентерального применения, возможно применение контейнеров и из стекла II гидролитического класса (силикатное стекло с высокой гидролитической стойкостью благодаря соответствующей обработке поверхности), предназначенных для препаратов для парентерального применения. Само по себе известково-натриевое стекло — это стекло на основе диоксида кремния, содержащее оксиды щелочных металлов, в основном оксид натрия, и

оксиды щелочно-земельных металлов, в основном оксид кальция. Благодаря своему составу известково-натриевое стекло характеризуется только средней гидролитической стойкостью. При контакте с лекарственными препаратами в виде растворов оно может изменять их pH вследствие вымывания компонентов стекла в раствор, что сказывается на стабильности препаратов в процессе хранения [14]. Высокая гидролитическая стойкость этого стекла достигается соответствующей обработкой внутренней поверхности, что дает возможность применения флаконов из такого стекла для упаковки растворов лекарственных сред с кислым или нейтральным значением pH.

Внутренняя поверхность стеклянных контейнеров может быть подвергнута специальной обработке для улучшения гидролитической стойкости, для придания водоотталкивающих свойств и др. Внешняя поверхность также может быть подвергнута обработке, например, для снижения трения и улучшения сопротивления абразивному износу. Обработка наружной поверхности не должна вызывать загрязнения внутренней поверхности контейнера.

Для контейнеров глазных капель можно использовать как бесцветное, так и окрашенное стекло. Бесцветное стекло обладает высокой прозрачностью в видимой области спектра. Окрашенное стекло получают добавлением небольших количеств оксидов металлов, выбранных в соответствии с необходимой спектральной поглощающей способностью, в основном для придания ему свето-защитных свойств.

В качестве укупорочных средств для стеклянных контейнеров с глазными каплями применяют пробки из различных эластичных материалов с обкаткой металлическими колпачками (для дальнейшего использования прилагается крышка-капельница в стерильной вакуумной упаковке) или капельные устройства из полимерных материалов. Пробки обычно изготовлены из натурального каучука, бромкаучука и хлоркаучука.

В Украине составные элементы стеклянных контейнеров, применяемых отечественными предприятиями при производстве глазных капель, выпускаются в соответствии с нормативными документами из следующих материалов, разрешенных МЗУ к использованию для изготовления первичной упаковки лекарственных средств:

1. Флаконы типа ФЛП номинальной вместимостью 5 мл и 10 мл с водостойкостью внут-

ренней поверхности класса А из стекла медицинского марки УСП – 1 – согласно ТУ У 00480945-006-98 (ОАО «Полтавский завод медицинского стекла»). Стекло медицинское марки УСП – 1 (ТУ У 00480945-002-96) по гидролитической стойкости соответствует I гидролитическому классу. До недавнего времени использовались флаконы российского производства из нейтрального стекла марки НС-1.

2. В качестве укупорочных средств применяются только пробки из резиновых смесей (бромкаучук) ИР-119, 52-599/1, И-51-1, И-51-2, выпускаемые двумя предприятиями:

- для флаконов вместимостью 5 мл – согласно ТУ У 21254680.004-96 (АО «Автозапчасть», г. Харьков);
- для флаконов вместимостью 10 мл – согласно ТУ У 6-00152253.013-96 (ОАО «Киевгума»).

3. Колпачки алюминиевые – согласно ТУ У 14257180.003 – 98 (Черновицкий завод медицинских изделий)

4. Прилагаемые к стеклянным флаконам крышки-капельницы из полиэтилена марки ПЭВД 15803-020 в стерильной вакуумной упаковке из пленки полиэтиленовой и бумаги ламинированной – согласно ТУ У 22480288.003-99 (ООО НПФ «Реафарм», г. Одесса). В соответствии с требованием [3], крышки-капельницы должны выдерживать испытание на стерильность, а также в процессе эксплуатации после вскрытия флакона обеспечивать сохранение качества препарата и своих физико-механических характеристик на весь предписанный период применения.

Основные проблемы стабильности глазных капель в стеклянных контейнерах связаны с укупорочными средствами, которые являются главным источником загрязнения растворов механическими частицами и их способностью адсорбировать ПАВ (консерванты) из растворов глазных капель [9], тем самым изменяя качество препарата. Совместимость материала укупорочного средства, как с активными компонентами, так и с консервантом, должна оцениваться в процессе фармацевтической разработки препарата [5].

Недостатками стеклянных контейнеров являются: масса флаконов, хрупкость, большие энерго- и трудозатраты при подготовке упаковки.

Для лекарственных средств стекло всегда было и остается наиболее подходящим материалом. Однако с 1970 года, когда были созданы физиологически безвредные пластмассы,

позволившие решить энергетические затруднения, связанные со стадиями подготовки упаковки из стекла, эти материалы получили широкое признание в качестве упаковочных для контейнеров офтальмологических растворов. По сравнению со стеклянными флаконами полимерные контейнеры имеют меньшую массу, более устойчивы к механическим воздействиям при транспортировке и обращении, имеют более низкую стоимость и больше возможностей для дизайна, имеют меньшую толщину стенки, что определяет гибкость, эластичность и жесткость флакона.

В общем случае, материалы, из которых изготавливают контейнеры для фармацевтических препаратов, состоят из одного или более полимеров, в которые могут быть включены определенные добавки. Эти материалы не включают никаких веществ, которые могли бы экстрагироваться содержимым контейнера в таких количествах, чтобы повлиять на эффективность, стабильность препарата или придать ему токсические свойства.

Природа и количество добавок определяются типом полимера, технологией переработки полимера в изделие и предполагаемой областью применения. Добавки могут включать антиоксиданты, стабилизаторы, пластификаторы, смазывающие вещества, красители и модификаторы ударостойкости.

При выборе подходящего пластмассового контейнера необходимо знать полный состав пластического материала при его производстве, включая все материалы, применяемые в процессе формования контейнера, для того, чтобы оценить потенциальные риски.

Пластмассовый контейнер, выбранный для любого конкретного препарата, должен отвечать следующим условиям:

– ингредиенты продукта, находящегося в контакте с пластическим материалом, не должны адсорбироваться его поверхностью и мигрировать внутрь пластика или сквозь него в значительной степени;

– пластический материал не должен выделять в содержимое контейнера никаких веществ в количествах, достаточных для того, чтобы воздействовать на стабильность препарата или являться потенциально опасными в отношении токсичности;

– материал упаковки должен служить барьером для жидкостей, водяных паров и газов.

Используя материал или материалы, выбранные в соответствии с этими критериями, готовят определенное число идентичных об-

разцов контейнеров, используя хорошо отработанную методику, и подвергают их практическим испытаниям в условиях, воспроизводящих условия их предполагаемого использования, включая, если это целесообразно, стерилизацию. Для того, чтобы подтвердить совместимость контейнера и его содержимого и убедиться в отсутствии изменений, оказывающих отрицательное воздействие на качество препарата, проводят различные испытания, такие как проверка отсутствия изменений физических характеристик; оценка любых потерь или прироста, связанных с проницаемостью; определение изменений рН; оценка изменений, вызванных воздействием света; химические испытания; биологические испытания.

Метод производства полимера должен обеспечивать возможность его воспроизведения для последующего производства в больших объемах, а условия производства выбираются таким образом, чтобы предотвратить возможность загрязнения другими пластическими материалами или их ингредиентами. Производитель продукта обязан гарантировать, что контейнеры, изготавливаемые в условиях производства, во всех отношениях подобны типовым образцам.

В принципе, не существует абсолютно инертных упаковочных материалов, и, за исключением металла и стекла, ни один материал не обеспечивает полностью непроницаемый барьер для газов, включая водяные пары.

Для полимерных материалов механизм взаимодействия препарат / контейнер / окружающая среда включает:

1. Поверхность контакта препарат / контейнер.

- Вещества, диффундирующие из материалов контейнера в препарат:

- добавки;
- мономеры, димеры, олигомеры, низкомолекулярные полимеры;
- остаточные растворители;
- остатки катализаторов;
- влага;
- продукты термической и окислительной деструкции и разложения под действием света.

- Вещества, диффундирующие из препарата в материалы контейнера: растворители, влага, жиры; масла, низкомолекулярные продукты.

2. Поверхность контакта полимер / полимер: диффузия полимеров на поверхности контакта, миграция адгезива из этикетки.

3. Поверхность контакта контейнер / окружающая среда.

- Вещества, диффундирующие из окружающей среды в препарат или из препарата в окружающую среду (газы, летучие вещества), а также запахи.

В соответствии с фармакопейными требованиями и положениями GMP для определения степени взаимодействия препарата и материала упаковки применяют следующие методы испытаний: высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая и тонкослойная хроматография, ИК — спектроскопия и др.

Контейнер считают подходящим для предполагаемых целей использования, если он выдерживает испытание на совместимость с содержимым контейнера.

Согласно Европейской Фармакопее и Фармакопее США наиболее часто используемыми полимерами для контейнеров глазных капель являются полиэтилен низкой плотности (без добавок и с добавками) и полипропилен.

Эти материалы относятся к полиолефинам — термическим полимерам, мономеры которых состоят минимум из двух атомов углерода. Полиэтилен без добавок для контейнеров глазных капель получают полимеризацией этилена под высоким давлением в присутствии кислорода или инициаторов образования свободных радикалов в качестве катализаторов. Относительная плотность составляет от 0.910 до 0.937. Размягчается при температуре выше 65 °С. Для выполнения защитных функций от воздействия света в состав полиэтилена вводят оксиды металлов, чаще всего — диоксид титана. Такой полиэтилен имеет более широкий интервал значений относительной плотности (0.890 — 0.965) и температуры размягчения (между 70 °С и 140 °С).

Для изготовления флаконов способом Blow-Fill-Seal packaging system (выдувающая-наполняющая-герметизирующая упаковочная система), который применяется отечественными фармацевтическими предприятиями (ОАО «Фармак», ОАО «Концерн «Стирол»), используется полиэтилен низкой плотности марки Lupolen 3020 D производства фирмы «BASF» (Германия). Полиэтилен данной марки разрешен МЗУ к использованию в фармацевтической промышленности для изготовления контейнеров для жидких лекарственных средств. В бывшем СССР фармацевтическими предприятиями (Каунас-

ский завод эндокринных препаратов, завод «Белмедпрепараты») для изготовления контейнеров данным способом в производстве глазных капель применялся материал с близкими характеристиками - полиэтилен низкой плотности (высокого давления) марки ПЭВД 15803-020, разрешенный для изготовления упаковки лекарственных средств. Контейнеры из этого материала обеспечивают стабильность целого ряда офтальмологических препаратов [15-18].

К недостаткам полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) как упаковочного материала относятся: проницаемость для паров и газов, и, как следствие, уменьшение объема содержимого упаковки и изменение концентрации компонентов препарата; образование трещин от напряжения в процессе использования; изменение характеристик вследствие повторного нагревания, УФ-облучения; адсорбция компонентов препарата, находящегося с ним в контакте.

Для полиэтилена так же, как и для резиновых материалов, в процессе фармацевтической разработки препарата должна быть тщательно исследована совместимость с компонентами препарата. Наряду с кристаллической областью в структуре полиэтилена присутствует и аморфная, в которой может происходить адсорбция компонентов содержимого упаковки. Неоднократно приводились сообщения о сорбции консервантов (хлорбутанола, тиомерсала и фенилртутных солей) из составов глазных капель, помещенных во флаконы из ПЭНП [19, 20]. В упаковке из ПЭНП может происходить разложение веществ, склонных к окислению [21].

Полипропилен состоит из гомополимера пропилена или сополимера пропилена с не более 25 % этилена или смеси полипропилена с не более 25 % полиэтилена. В состав пропилена вводят определенное количество добавок с целью обеспечения пригодности применения по назначению. Данный полимер размягчается при температуре около 120 °С. Полипропилен, по сравнению с полиэтиленом, характеризуется более высокой термостойкостью и высокой прочностью (жесткостью), однако становится хрупким при низких температурах. Применение полипропилена в качестве материала для упаковки стерильных растворов в настоящее время расширяется, что связано с разработкой нового термоформирующего оборудования. Удачным решением применения полипропилена являются одноразовые контейнеры для растворов

для обработки контактных линз. В Украине производство глазных капель в контейнерах из полипропилена отсутствует.

На фармацевтический рынок Украины глазные капли поступают в различных видах первичной упаковки, в том числе и в тех, производство и применение которых на отечественных предприятиях отсутствует. Поэтому к вопросу стабильности разрабатываемых препаратов-генериков в первичных упаковках, выполненных из материала, отличающегося от материала упаковки оригинальных препаратов, необходимо подходить ответственно. Не всегда препарат-генерик, являющийся полным аналогом выбранного оригинального препарата, оказывается стабильным в упаковке, изготовленной из материала, отличающегося от материала упаковки оригинального препарата, что должно определяться в процессе фармацевтической разработки ЛС.

Выводы

1. Одним из факторов, обеспечивающих сохранность лекарственного препарата в процессе хранения, является материал первичной упаковки.
2. Выбор материалов контейнера должен основываться на результатах, проведенных при фармацевтической разработке исследований:
 - его защитного действия на содержимое упаковки от внешних факторов;
 - взаимодействия контейнер/содержимое;
 - влияния условий производственного процесса на контейнер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриюкова Л.Н. Актуальные вопросы создания и производства глазных капель в Украине // Фармаком. – 2003. - № 3. - С. 50-54.
2. Андриюкова Л.Н. Первичная упаковка глазных капель: материалы для контейнеров и фармацевтическая разработка // Фармаком. – 2003. - № 4. - С. 57-63.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – С. 515-517.
4. European Pharmacopoeia, 4th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2002. - 2416 p.
5. Надежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – К.: МОРИОН, 2001. – 472 с.
6. Надежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – К.: МОРИОН, 1999. – 896 с.
7. The International Pharmacopoeia, 3rd ed. - P. 7 – 11.
8. United States Pharmacopoeia, XXIV ed. - Rockville, 2000. - 2570 p.

9. Van Ooteghem, M., Augenpreparate. In: Nurnberg, E., Surmann, P. (Eds.), Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 2: Methoden. - Berlin: Springer-Verlag, 1991. - P. 649-650.
10. Исследование стабильности глазных капель, изготовленных с помощью стерилизующего фильтрования // И.В. Беседина, Н.И. Бессонова, В.В. Карчевская и др. // Фармация. - 1982. - № 3. - С. 23-25.
11. Бессонова Н.И., Василевская В.Ю. Стабильность глазных капель в процессе использования // Фармация. - 1991. - № 3. - С. 59-62.
12. Поленок Р.А., Русак А.В., Молдавер Б.Л. К вопросу о стабилизации глазных капель сульфацидазина-натрия // Фармация. - 1993. - № 5. - С. 52-54.
13. Трохимчук В.В., Коритнюк Р.С., Голуб А.Г. Проблема стабильности в технологии очных капель с витамином // Фармация. - 1995. - № 2. - С. 32-35.
14. Partilla, T., Skinner, F., Dolder, R. Technologie der Behälter. In: Dolder, R., Skinner, F. (Eds.). Ophthalmica. Band 1: Pharmazeutische Grundlagen ihrer Zubereitung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. - Stuttgart, Germany, 1975. - P. 414 - 429.
15. Иноземцева Н.В., Кондратьева Т.С., Вергазова С.Ю., Денисова Т.В. Разработка технологии глазных капель ортофена (0.1 % и 0.2 % раствора) // Фармация. - 1997. - № 6. - С. 19-21.
16. Иноземцева Н.В., Кондратьева Т.С., Вергазова С.Ю., Денисова Т.В. Стабильность глазных капель ортофена в полиэтиленовых тьюб-капельницах // Фармация. - 1998. - № 2. - С. 25-27.
17. Кондратьева Т.С., Вергазова С.Ю., Денисова Т.В. Технология комбинированных глазных капель - адреноблокатора анаприлина с холиномиметическим средством // Фармация. - 1991. - № 4. - С. 30-32.
18. Левчук Т.А., Ермакова В.Н. Разработка и экспериментальное изучение отечественной формы тимолола (0.25 % и 0.5 % растворы глазных капель) // Хим.-фармац. журн. - 2000. - Т. 34, № 6. - С. 41-42.
19. Aspinall JE, Duffy TD, Taylor CG. The effect of low-density polyethylene containers on some hospital-manufactured eye-drop formulations. Inhibition of the sorption

- of phenylmercuric acetate // J. Clin. Hosp. Pharm. - 1983. - No. 8(3). - P. 233-240.
20. Holdsworth DG, Roberys MS, Polack AE. Fate of chlorbutol during storage in polyethylene dropper containers and simulated patient use // J. Clin. Hosp. Pharm. - 1984. - No. 9 (1). - P. 29-39.
21. Barnes AR. Compatibility of a commercially available low-density polyethylene eye-drop container with antimicrobial preservatives and potassium ascorbate // J. Clin. Pharm. Ther. - 1995. - No. 20 (6). - P. 341-344.

Резюме

Андрюкова Л.М.

Первинна упаковка офтальмологічних розчинів: матеріали, що використовуються для виробництва контейнерів, і фармацевтична розробка

Стаття присвячена актуальним питанням сучасного стану фармацевтичного виробництва України: вимогам до матеріалів, що використовуються для виробництва контейнерів для очних крапель, та необхідності вивчення їх сумісності з конкретним препаратом при проведенні фармацевтичної розробки.

Summary

Andrykova L.N.

Containers for ophthalmologic solutions: materials used for container production and pharmaceutical development

This article is devoted to the matters of current state of pharmaceutical manufacture in Ukraine: requirements for materials used for production of containers for eye drops, and the need in study of compatibility of ones with an individual drug when pharmaceutical development carrying out.

Андрюкова Лариса Николаевна. Окончила Харьковский политехнический институт. Работает в ГП ГНЦАС (с 1982). К.фарм.н. (1994). Зав. лабораторией глазных, ушных и назальных лекарственных форм (ЛГУНЛФ).

Фармакологічні дослідження

УДК 615.03

Хохленкова Н.В., Либина В.В., Резниченко А.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Фармакокинетическое исследование мази «Пролидоксид»

Изучены основные параметры фармакокинетики и системная биодоступность фенольного гидрофобного препарата прополиса (ФГПП), входящего в состав мази «Пролидоксид», при накожном нанесении кроликам в норме и при экспериментальной патологии. Установлено, что ФГПП быстро проникает через все слои кожи в системный кровоток. За счет состава мази трансдермальное всасывание носит продолжительный характер. Мазь «Пролидоксид» оказывает как местное, так и системное действие, обуславливающее его высокую фармакологическую активность.

Учитывая высокий уровень травматизма, большую численность послеоперационной и ожоговой патологии, создание и внедрение в медицинскую практику новых высокоэффективных и достаточно безопасных комбинированных препаратов на основе биологически активных веществ природного происхождения, обладающих широким спектром фарма-

кологических свойств, является актуальной задачей фармации и медицины. Для реализации данной задачи разработана оригинальная мазь под условным названием «Пролидоксид» [1].

Мазь «Пролидоксид» представляет собой мягкую лекарственную форму для накожного применения на основе фенольного гидро-

фобного препарата прополиса (ФГПП), предназначенную для лечения I фазы раневого процесса, ожоговой болезни, пролежней. ФГПП обуславливает антимикробную, противовоспалительную, репаративную активность мази «Пролидоксид»; лидокаин обеспечивает местноанестезирующее действие [2].

Мазь «Пролидоксид» рекомендуется применять для лечения патологических процессов, которые затрагивают не только поверхностные слои кожи, но и распространяются на подлежащие ткани, в связи с чем, системная биодоступность препарата является клинически значимой для его фармакотерапевтической эффективности.

Целью настоящей работы является исследование степени и кинетики трансдермального всасывания основной действующей субстанции мази «Пролидоксид» – фенольного гидрофобного препарата прополиса при накожном нанесении животным. Поскольку трансдермальное всасывание лекарственных средств в значительной степени зависит от состояния кожного покрова, системную биодоступность мази «Пролидоксид» исследовали у животных в норме (без нарушения целостности кожи) и при экспериментальной патологии (на фоне скарификации эпидермиса).

Экспериментальная часть

Объектом исследования явилась мазь «Пролидоксид» на гидрофильной основе (ПЭО-400 и ПЭО-1500), содержащая ФГПП – 5 % и лидокаина гидрохлорид – 5 %.

Комплексными химическими, микробиологическими и фармакологическими исследованиями доказано, что биологическая активность ФГПП обусловлена, в первую очередь, фенольными соединениями [3]. Исследования, проведенные методом тонкослойной хроматографии, позволили идентифицировать в составе ФГПП следующие флавоноиды: кверцетин, кемпферол, апигенин и лютеолин [4]. В настоящем исследовании для изучения фармакокинетики в качестве «маркера» использовали кверцетин.

Исследования проведены в соответствии с рекомендациями Государственного фармакологического центра МЗ Украины «Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственных средств» [5] и с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей [6].

Опыты проведены на половозрелых кроликах обоего пола породы шиншилла со средней массой тела 4.0 кг. Первой группе кроликов предварительно (за 20 ч) до аппликации мази «Пролидоксид» депилировали участок кожи на спине, не нарушая ее целостности, площадью 100 см². На подготовленный участок кожи наносили тонким слоем исследуемую мазь в количестве 5 г. С целью исследования влияния кожной патологии на трансдермальное всасывание ФГПП, второй группе кроликов после предварительной депиляции, но непосредственно перед нанесением мази в той же дозе, проводили скарификацию эпидермиса.

Кровь для анализа отбирали из краевой вены уха кроликов в течение 6 ч после кожной аппликации мази.

Плазму крови получали центрифугированием (3000 об/мин, 5 мин). Аналитические процедуры проводили непосредственно после получения плазмы.

Для аналитического определения концентраций кверцетина в плазме использовали разработанный нами метод жидкостной хроматографии (ЖХ) с предварительной жидкофазной экстракцией и концентрированием тестируемого вещества. Количественное определение содержания кверцетина в плазме проводили с использованием ЖХ-системы GILSON (Франция) с ультрафиолетовым детектором UV-VIS Holochrome. С целью разделения пика кверцетина и пиков эндогенных веществ плазмы, использовали подход двухступенчатого элюирования.

Экстракцию кверцетина из плазмы проводили диэтиловым эфиром в течение 15 мин с последующим выпариванием органической фазы под вакуумом до сухого остатка и его растворением в подвижной фазе для хроматографирования. Степень экстракции кверцетина из плазмы составила 93 %.

Условия хроматографирования: хроматографическая колонка размером 100 мм x 4 мм, SEPARON CGX C18, 5 мкм; подвижная фаза А (7 мин): ацетонитрил – вода - кислота уксусная концентрированная (30:69:1); подвижная фаза В: ацетонитрил – вода – кислота уксусная концентрированная (70:29.5:0.5); скорость подвижной фазы - 0.65 мл/мин; длина волны детектирования - 265 нм. Время удерживания тестируемого компонента - 10.5 мин.

Предварительная проверка методики показала, что при ее использовании достигает-

Рисунок 1



Типичная хроматограмма плазмы крови кролика, содержащей кверцетин

- 1 — эндогенные вещества плазмы;
2 — кверцетин ($t_R = 10.5$ мин);
3 — кемпферол ($t_R = 16.0$ мин).

ся воспроизводимость результатов и достаточное для количественного определения разделение пика кверцетина от пиков экстрактивных веществ плазмы. Типичная хроматограмма плазмы, содержащей кверцетин, представлена на Рис. 1. Как видно, на хроматограмме имеются пики, соответствующие эндогенным веществам плазмы, кверцетину, а также еще одному флавоноиду, входящему в состав ФГПП, идентифицированному как кемпферол.

Количественное содержание кверцетина определяли методом внешнего стандарта. В диапазоне концентраций от 0.2 мкг/мл до 2.5 мкг/мл существует линейная зависимость между площадью пика и концентрацией кверцетина.

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов с использованием прикладной программы M-ind [7]. Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация (C_{max}), время ее достижения (T_{max}), константа всасывания (K_{01}), период полувыведения препарата ($T_{1/2}$), константа элиминации (K_{el}), среднее время удерживания препарата в крови (MRT), площадь под фармакокинетической кривой в пределах длительности наблюдения за концентрацией лекарственного вещества ($AUC^{0 \rightarrow t}$), площадь под фармакокинетической кривой в пределах от 0 до ∞ ($AUC^{0 \rightarrow \infty}$), отно-

шение $C_{max}/AUC^{0 \rightarrow \infty}$, характеризующее скорость всасывания, а также относительную биодоступность (f' , %) препарата в условиях патологии кожи по сравнению с нормой, рассчитанную как $AUC^{0 \rightarrow \infty}_p/AUC^{0 \rightarrow \infty}_N$ и $AUC^{0 \rightarrow t_p}/AUC^{0 \rightarrow t_N}$.

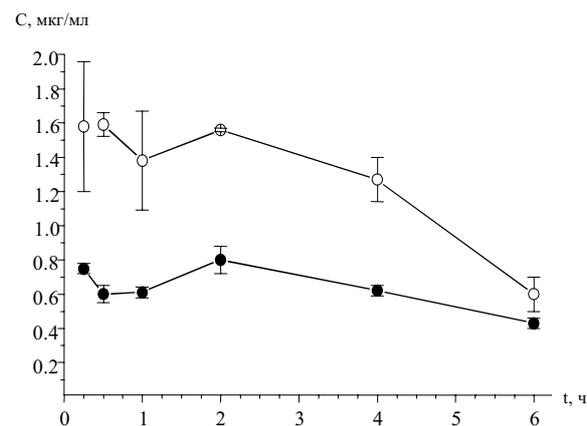
Полученные экспериментальные данные статистически обработаны с помощью программы MICROCAL ORIGIN® (MicroSoft Inc., США). Для каждого показателя рассчитывали: среднее арифметическое значение (Mean), стандартное отклонение среднего результата (SD) и стандартную ошибку (SE). Достоверность различий между средними значениями определяли по t-критерию Стьюдента. Вероятность полученных результатов оценивали на уровне значимости не менее 95 % ($p \leq 0.05$).

Результаты исследований и их обсуждение

Фармакокинетические кривые, отражающие динамическое изменение уровня действующего вещества в плазме кроликов, представлены на Рис. 2.

Как свидетельствуют представленные данные, после аппликации кроликам мази «Пролидоксид» в норме (без повреждения кожного покрова) уже через 15 мин регистрируется высокий уровень кверцетина в плазме, что свидетельствует о быстром начальном всасывании препарата в системный кровоток. Средняя концентрация кверцетина в этот период ($C_{0.25}$) составляет 0.75 мкг/мл, что прак-

Рисунок 2



Фармакокинетические кривые кверцетина в плазме крови кроликов после накожного нанесения мази «Пролидоксид»

- — норма (животные без нарушения целостности кожного покрова);
○ — патология (животные со скарификацией эпидермиса).

тически равно ее максимальным значениям в плазме. В течение следующих 45 мин на фармакокинетической кривой отмечается незначительная тенденция в сторону снижения уровня кверцетина в плазме ($C_{0.5} = 0.60$ мкг/мл, $C_{1.0} = 0.61$ мкг/мл), с последующим его повышением ко 2-му часу после нанесения препарата. Регистрируемое изменение концентрации кверцетина в течение первых двух часов в целом можно рассматривать как период установления равновесия между скоростью всасывания кверцетина в кровь и его распределения в ткани. При этом, как видно, трансдермальное всасывание действующего вещества из мази "Пролидоксид" носит постепенный, поддерживающий характер, что обеспечивает в итоге длительную циркуляцию препарата в крови без резких пиковых значений. Максимальная концентрация (C_{max}) кверцетина составляет 0.80 мкг/мл, а время ее достижения (T_{max}) – в среднем равно 2 ч. Далее на фармакокинетической кривой наблюдается постепенное снижение уровня кверцетина, обусловленное преобладанием процесса его плазменной элиминации за счет распределения в ткани, метаболизма и выведения. К 6-му часу после кожного нанесения мази «Пролидоксид» в крови регистрируются концентрации кверцетина, составляющие в среднем около 50 % от максимальных значений кверцетина в плазме.

При нарушении целостности кожного покрова, вызванном скарификацией эпидермиса, наблюдается значительное повышение

степени трансдермального всасывания мази «Пролидоксид» по сравнению с нормой. Так, через 15 мин после аппликации мази концентрация кверцетина в плазме составляет 1.58 мкг/мл, что в 2 раза выше аналогичного значения у кроликов без повреждения кожи. Плазменное содержание препарата поддерживается практически на данном уровне до 2 ч ($C_{2.0} = 1.56$ мкг/мл). C_{max} составляет 1.59 мкг/мл и регистрируется через 0.5 ч после нанесения мази. Преобладание процессов элиминации препарата наблюдается, начиная со 2 часа. Через 6 ч после нанесения мази в крови определяется около 40 % от максимальной концентрации кверцетина.

Следует отметить, что концентрация кверцетина в плазме крови кроликов с патологией кожи в течение всего периода наблюдения достоверно выше, чем в норме. При этом фармакокинетические кривые у двух групп животных имеют аналогичный профиль: высокий начальный уровень, поддерживающее плато до 2-ого часа с последующим постепенным снижением.

Анализ результатов количественного определения кверцетина показывает, что индивидуальная вариабельность концентраций тестируемого вещества в плазме крови кроликов в норме очень незначительна, о чем свидетельствуют коэффициенты вариации, лежащие в диапазоне от 11 % до 25 %. При патологии кожи, вызванной скарификацией эпидермиса, индивидуальный разброс результатов повышается.

Таблица

Основные фармакокинетические параметры кверцетина при однократном кожном нанесении кроликам мази «Пролидоксид»

Параметры фармакокинетики	Норма	Патология
C_{max} , мкг/мл	0.80	1.59
T_{max} , ч	2.0	0.5
K_{01} , ч ⁻¹	0.01	0.009
K_{el} , ч ⁻¹	0.155	0.239
$T_{1/2}$, ч	4.47	2.90
MRT, ч	6.96	4.67
$AUC^{0 \rightarrow t}$, мкг ч/мл	3.74	7.51
$AUC^{0 \rightarrow \infty}$, мкг ч/мл	6.56	10.26
$C_{max} / AUC^{0 \rightarrow \infty}$, ч ⁻¹	0.122	0.155
C_{maxP} / C_{maxN}	-	1.99
f' , %	100.0	156.4 (200.8)*

Примечание

* – в скобках приведены значения относительной биодоступности, рассчитанные как $AUC^{0 \rightarrow 6}_P / AUC^{0 \rightarrow 6}_N$

В Таблице представлены основные фармакокинетические параметры мази «Пролидоксида», рассчитанные модельно-независимым методом статистических моментов на основании данных о концентрации кверцетина в плазме крови кроликов в норме и в условиях патологии после однократного нанесения препарата.

Как видно из приведенных данных, у кроликов без патологии мазь «Пролидоксид» достаточно быстро проникает через кожный барьер и всасывается в системный кровоток, что подтверждается величиной значений фармакокинетических параметров, характеризующие скорость всасывания кверцетина ($t_{\max} = 2$ ч, $K_{01} = 0.01$ ч⁻¹, $C_{\max}/AUC^{0 \rightarrow \infty} = 0.122$ ч⁻¹).

Препарат относительно длительно циркулирует в крови: среднее время удерживания кверцетина в крови (MRT) и время его полувыведения ($T_{1/2}$) для мази «Пролидоксида» составляют соответственно: 6.96 ч и 4.47 ч; константа элиминации (K_{el}) — 0.155 ч⁻¹. Поскольку известно [8, 9], что для кверцетина, как и других флавоноидов, характерен очень быстрый метаболизм и высокая скорость выведения при инъекционном и пероральном путях введения, установленные особенности его фармакокинетики при кожном нанесении можно объяснить поддерживающим характером трансдермального всасывания, обусловленного составом мази «Пролидоксида».

При повреждении кожи время достижения максимальной концентрации кверцетина в крови регистрируется значительно быстрее, чем в норме ($T_{\max} = 0.5$ ч), при этом величина C_{\max} в 2 раза выше. Отношение $C_{\max P}/C_{\max N}$ составляет 1.99. Расчет и соотношение площадей под фармакокинетическими кривыми у двух сравниваемых групп животных свидетельствуют о более высокой степени трансдермального всасывания препарата при патологии кожи. Степень относительной биодоступности (f') при нарушении целостности кожного покрова составляет 200.8 % в интервале периода регистрации концентраций кверцетина и 156.4 % - при экстраполяции фармакокинетической кривой от 0 до ∞ . Таким образом, системная биодоступность мази «Пролидоксида» при патологии в 1.5-2 раза выше, чем в норме. При этом константы, характеризующие скорость распределения и выведения препарата (K_{el} , $T_{1/2}$ и MRT) в условиях патологии составляют, соответственно, 0.239 ч⁻¹, 2.9 ч и 4.67 ч.

Выводы

1. Рассчитаны системные константы фармакокинетики, характеризующие степень и скорость всасывания фенольного гидрофобного препарата прополиса в форме гидрофильной мази «Пролидоксида» в кровь, динамику его распределения в ткани и выведения из организма при кожных аппликациях животным в норме и при экспериментальной патологии.

2. Установлено, что фенольный гидрофобный препарат прополиса быстро проникает через все слои кожи в системный кровоток. За счет состава вспомогательных веществ мази трансдермальное всасывание носит продолжительный, поддерживающий характер, что обеспечивает хорошее распределение действующих веществ препарата в ткани и их длительную циркуляцию в крови.

3. При патологии, связанной с нарушением целостности кожного покрова или нарушением сосудисто-тканевой проницаемости (I фаза раневого процесса, ожоговая болезнь, пролежни), системная биодоступность фенольного гидрофобного препарата прополиса значительно выше, чем в норме.

4. Мазь «Пролидоксида» при кожном нанесении животным оказывает как местное, так и общерезорбтивное действие, обуславливающее его высокую фармакологическую активность. Учитывая, что вышеуказанные патологические процессы, для лечения которых рекомендуется мазь «Пролидоксида», затрагивают не только поверхностные слои кожи, но и вызывают серьезные нарушения в подлежащих тканях, высокая системная биодоступность разработанного препарата является принципиально важной для его фармакотерапевтической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Розробка та дослідження мазі з фенольним гідрофобним препаратом прополісу / Тихонова С.О., Хохленкова Н.В., Ярних Т.Г., Чушенко В.М. // Вісник фармації. — 2000. - № 2 (22). — С. 26-26.
2. Яковлева Л.В., Кальф-калф С.С., Ткачева О.В. Фармакологическое изучение новой ранозаживляющей мази «Пролидоксида» // Провизор. — 1999. - № 1.
3. Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса / Тихонов А.И., Ярних Т.Г., Черных В.П. и др. / Под ред. Тихонова А.И. — Харьков: Основа, 1998. — 384 с.
4. Хохленкова Н.В., Ярних Т.Г., Чушенко В.Н. Исследования мази с фенольным гидрофобным препаратом прополиса // Фармаком. — 2003. - № 3. — С. 75-78.
5. Доклінічне вивчення фармакокінетики лікарських засобів / Головенко М.Я., Зінковецький В.Г., Жук О.В. та ін. // Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / Під ред. О.В. Стефанова. — Київ, 2001. - С. 515-527.

6. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. – Київ: Авіцена, 2002. – 156 с.
7. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-IND для оценки системных параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов // Хим.-фарм. журнал. - 1991. - № 10. - С. 16-19.
8. Количественное определение дигидрокверцетина методом ВЭЖХ / Воскобойникова И.В., Геодакян С.В., Тюкавкина Н.А. и др. // Фармация. - 1992. - № 6. - С. 74-75.
9. Voskoboinikova I.V., Tjukavkina N.A., Kolhir V.K. Experimental Pharmacokinetics of Biologically Active Plant Phenolic Compounds. II Pharmacokinetics of Likviritin // Phytotherapy Res. - 1992. - Vol. 1. - P. 368-372.

Резюме

Хохленкова Н.В., Лібіна В.В., Резниченко А.А.

Фармакокінетичне дослідження мазі «Пролідоксид»

Досліджено основні параметри фармакокінетики та системна біодоступність фенольного гідрофобного препарату прополісу (ФГПП), який входить до складу мазі «Пролідоксид», при нашкірному нанесенні кроликам у нормі та за експериментальної патології. Встановлено, що ФГПП швидко проникає крізь усі шари шкіри до системного кровотоку. За рахунок складу мазі трансдермальне усмоктування має довготривалий характер. Мазь «Пролідоксид» виявляє як місцеву, так і системну дію, яка обумовлює її високу фармакологічну активність.

УДК 615.015 : 616.314.17

Коритнюк Р.С., Давтян Л.Л., Коритнюк О.Я., Серета П.І.
Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика

Визначення фармакокінетичних параметрів лікарських плівок «Віруплен» у крові щурів

Експериментально визначені фармакокінетичні параметри лікарських плівок «Віруплен» у крові щурів. Встановлені числові значення періоду напіввиведення, кліренсу, сумарної площі під фармакокінетичною кривою «концентрація-час», об'єму розподілу, констант швидкості всмоктування та елімінації тощо. Одержані результати дозволяють припустити, що лікарські плівки «Віруплен» мають безумовний інтерес для терапії герпес-вірусної інфекції.

За останні роки у зв'язку з динамізмом створення нових лікарських засобів (ЛЗ) проблема їх раціонального використання привертає увагу світової громадськості з тим, щоб зробити медикаментозну терапію по можливості більш оптимальною та безпечною.

Для раціонального використання нових ЛЗ, досягнення максимальної терапевтичної дії та послаблення перебігу побічних реакцій необхідні дослідження, які дозволять одержати всебічну характеристику препарату. Із моменту надходження ЛЗ в організм до розвитку відповідного клінічного ефекту можна умовно виділити три фази або стадії: фармацевтичну, фармакокінетичну та фармакоди-

Summary

Khokhlenkova N.V., Libina V.V., Reznichenko A.A.

Pharmacokinetic research of «Prolidoxyd» ointment

The basic pharmacokinetics parameters and system bioavailability of phenolic hydrophobic preparation of propolis (PHPP) included in composition of «Prolidoxyd» ointment were studied when cutaneous applying to the normal rabbits and rabbits with experimental pathology. It was established, that PHPP penetrates quickly through all the skin layers in the bloodstream. Due to the ointment composition the transdermal absorption is of long-term character. The «Prolidoxyd» ointment has both the local and the system effect, resulting in its high pharmacological activity.

Хохленкова Наталья Викторовна. Окончила Украинскую фармацевтическую академию (1996). Науч. сотр. лаборатории охраны труда ГП ГНЦАС.

Либина Виктория Витальевна. Окончила Харьковский государственный университет. Работает в ГП ГНЦАС (с 1978). Зав. лабораторией экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики (1998). К.б.н. (1997). Ст. науч. сотр. (2002).

Резниченко Андрей Андреевич (р. 1936). Окончил фармацевтический факультет 1-ого Московского медицинского института им. И.И. Сеченова. Работает в ГП ГНЦАС (с 1958). Ст.науч.сотр. лаборатории экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики (1998). К.фарм.н. (1970).

намічну. Фармацевтична фаза залежить від швидкості та характеру вивільнення діючих речовин із лікарської форми, а також від фізико-хімічних властивостей ЛЗ, тобто від біофармацевтичних факторів, а також від стану органів, в яких відбувається його адсорбція. Цей показник корелює з розчинністю ЛЗ при надходженні його в біологічні рідини організму [5-7].

Фармакокінетична фаза включає, в основному, класичну тетраду: процеси абсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції лікарських речовин.

Сьогодні неможливо уявити створення ліків, доклінічні та першу фазу клінічних випробувань без фармакокінетичних досліджень.

Метою даного повідомлення стало вивчення фармакокінетичних параметрів лікарських півок (ЛП) «Віруплен» у крові щурів.

ЛП «Віруплен», розроблені на кафедрі технології ліків та клінічної фармації КМАПО ім. П.Л. Шупика, являють собою полімерні пластинки масою 16 мг і містять основну діючу речовину ацикловір у кількості 680 мкг. Попередніми біофармацевтичними дослідженнями було обґрунтовано концентрацію діючих та допоміжних речовин, а також розроблено технологію та вивчено стабільність препарату [1,2].

Для дослідження фармакокінетичних параметрів ЛП «Віруплен» була використана однокамерна модель [3, 4].

Експериментальна частина

Фармакокінетичні параметри ЛП «Віруплен» досліджували у крові білих щурів лінії Вистар ($n = 5$) після однократного сублінгвального апікаційного введення препарату. Після введення препарату в організм через певні проміжки часу (від 3.75 хв до 480 хв) із хвостової вени щурів відбирали проби крові та за допомогою органічних розчинників проводили екстракцію діючої речовини. Час, що відповідав моменту взяття проб, послідовно подвоювався. Цей прийом дозволив звести до мінімуму кількість вимірів за експоненціального падіння концентрації препарату у крові. Після екстракції діючої речовини ефірні витяги упарювали до сухого залишку, який розчиняли у 500 мкл метанолу. Метанольний розчин досліджували хромато-мас-спектрометричним методом (ГХ-МС), визначаючи ацикловір. При цьому застосовували метод у режимі селективного моніторингу обраних іонів (SIM) 0.005 мкг/мл, який дозволяє проводити кількісне визначення ацикловіру. Чутливість методу становить 10^{-15} г.

Визначення проводили за таких умов: хроматограф – фірми «Agilent Technologies», модель 6850; мас-селективний детектор – модель 5973; колонка капілярна HP-5MS, розміром 25 м × 0.25 мм; температура інжектора –

280 °С; температура інтерфейса – 250 °С; температуру колонки програмують: температуру 90 °С витримують протягом 2 хв, підвищення температури зі швидкістю 20 °С/хв до 300 °С, температуру 300 °С витримують протягом 10 хв; об'єм проби, що уводиться, 3 мкл (split).

Умови детектування: енергія іонізації 70 еВ; режим сканування від 32 абсолютних одиниць маси до 800 абсолютних одиниць маси.

Характерні піки мас-спектру ацикловіру – m/z : 81, 124, 54, 53, 125, 171, 42, 45.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень представлені в Табл. 1.

Використовуючи одержані результати, будували фармакокінетичну криву «концентрація – час» (Рисунок) для ацикловіру.

Оскільки нам відома введена доза ацикловіру, можна оцінити фармакокінетичні параметри.

Щурам масою по 200 г була введена доза ацикловіру в ЛП $D = 680$ мкг. Отже, доза на

$$1 \text{ г маси щура складала } D/g = \frac{680}{200} = 3.40 \text{ мкг/г.}$$

Величини доз і частоту їх введення щурам визначав ряд патологічних і фізіологічних процесів. Стан щурів із точки зору фармакокінетики оцінювався за допомогою специфічних фармакокінетичних змінних. Основні з них – об'єм розподілу та кліренс.

Об'єм розподілу V_d , у мкг/г, визначали за формулою:

$$V_d = \frac{D}{C_0} = 20, \quad (1)$$

де:

D – доза лікарського засобу, мкг/г;

C_0 – уявна початкова концентрація діючої речовини, мкг/мл.

Для кількісної характеристики процесу елімінації використовували значення параметру «період напіввиведення лікарського препарату з організму», що характеризує

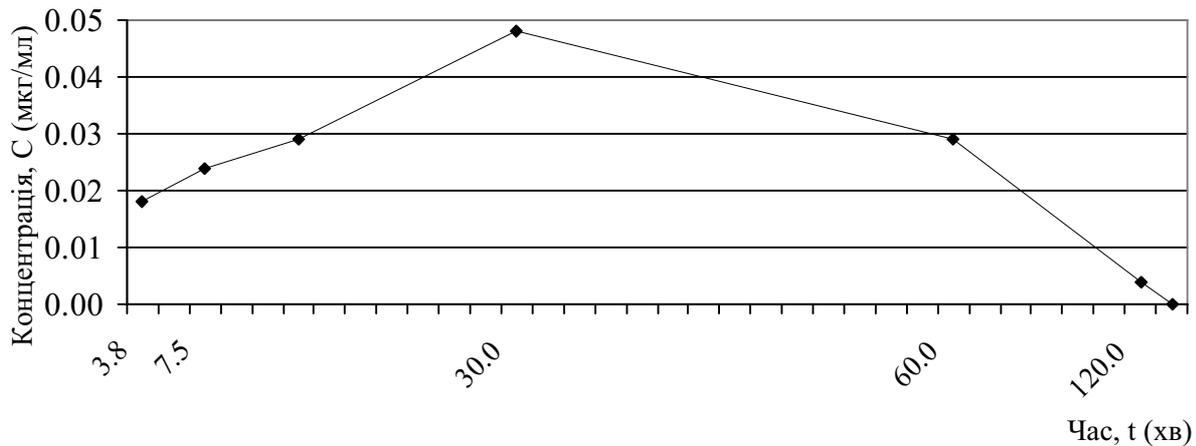
Таблиця 1

Концентрація ацикловіру у крові щурів ($P = 95\%$; $t = 2.74$; $\bar{X} = 5$)

Ацикловір	Час (хв)							
	3.75	7.5	15	30	60	120	240	480
концентрація, С, мкг/мл	0.018 ± ± 0.001	0.024 ± ± 0.002	0.029 ± ± 0.002	0.048 ± ± 0.004	0.029 ± ± 0.002	0.004 ± ± 0.0006	-	-

- діючих речовин не знайдено

Рисунок



Крива фармакокінетики ацикловіру

швидкість падіння вмісту препарату в досліджуваних рідинах і тканинах організму. Час напіввиведення препарату на ділянці кривої, що характеризує виведення ($T_{1/2} k_e$), обчислювали із фармакокінетичної кривої. Він становить 30 хв. Час напіввиведення препарату на ділянці кривої, що характеризує всмоктування, становить ($T_{1/2} k_a$) – 85.8 хв.

Параметр, який характеризує особливості зміни кількості лікарського препарату в об'ємі розподілу однокамерної фармакокінетичної моделі - константу швидкості елімінації препарату (k_e), у 1/хв, визначали за формулою:

$$k_e = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} = \frac{0.693}{30} = 0.023, \quad (2)$$

де:

$T_{1/2}$ – час напіввиведення, хв.

За (2) визначали константу швидкості всмоктування препарату k_a , що для ацикловіру становить 0.0081 1/хв. Виходячи зі значень констант k_e і k_a , можна сказати, що аплікаційне введення ЛП на ясна щурів являє приклад фліп-флоп феномена, тому що для ЛП константа швидкості елімінації ацикловіру більше константи швидкості його всмоктування.

Параметр «час досягнення максимальної концентрації у тканинах пародонта» (t_{max}) є функцією, що відображає співвідношення між величинами констант швидкості всмоктування й елімінації. t_{max} , у хвилинали, визначали за формулою:

$$t_{max} = \frac{\ln \frac{k_a}{k_e}}{k_a - k_e} = 69.79, \quad (3)$$

де:

k_e – константа швидкості елімінації діючої речовини, 1/хв;

k_a – константа швидкості всмоктування діючої речовини, 1/хв.

t_{max} – для ацикловіру становить 69.79 хв.

Кліренс препарату пов'язаний із константою швидкості елімінації та об'ємом розподілу таким чином:

$$Cl = k_e \cdot V_d = 0.46, \quad (4)$$

де:

Cl – кліренс препарату, мл/(хв·г);

k_e – константа швидкості елімінації препарату, 1/хв;

V_d – об'єм розподілу, мл/г

Кліренс ацикловіру, у перерахунку на 200 г маси щурів: $Cl_{200} = 92$ мл/хв.

Площу під фармакокінетичною кривою (AUC) - концентрацію лікарського препарату від моменту його введення в організм до повного видалення з нього - обчислювали за формулою:

$$AUC = \frac{D}{Cl} = 7.39, \quad (5)$$

де:

AUC – площа під фармакокінетичною кривою, мкг·хв/мл;

D – доза лікарського препарату, мкг/г;

Cl – кліренс препарату, мл/(хв·г).

Середній час утримування (MRT) лікарської речовини, у хвилинали, визначали за формулою:

$$MRT = \frac{1}{k_e} = 43.7, \quad (6)$$

де:

k_e – константа швидкості елімінації препарату, 1/хв.

Сумарну площу під фармакокінетичною кривою за певний час AUMC, у мкг·хв/мл, визначали за формулою:

$$AUMC = MRT \cdot AUC = 321, \quad (7)$$

де:

MRT – середній час утримування, хв;

AUC – площа під фармакокінетичною кривою, мкг·хв/мл.

Зведені фармакокінетичні параметри для ацикловіру наведені в Табл. 2.

Таким чином, одержані дані свідчать, що ЛП «Віруспен» мають переважно місцеву дію та завдяки швидкій елімінації не чинять негативного впливу на організм.

Висновок

1. Експериментально визначено фармакокінетичні параметри плівок „Віруспен” у крові щурів. Зокрема, встановлені числові значення параметрів: період напіввиведення, кліренс, сумарна площа під фармакокінетичною кривою "концентрація-час", об'єм розподілу, константа швидкості всмоктування та елімінації тощо.

2. Встановлено, що лікарські плівки «Віруспен» мають переважно місцеву дію.

Результати експерименту дають можливість прогнозувати дію стоматологічних плівок «Віруспен» на організм людини і бу-

дуть покладені в основу програми клінічних досліджень.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян Л.Л., Дзюбан Н.Ф. Бирюкова С.В., Корытнюк О.Я. Вивчення противірусної активності стоматологічних пародонтальних плівок «Віруспен»: Зб. наук. пр. співр. КМАПО ім П.Л. Шупика. – Київ, 2000. - Вип. 9. – Кн. 1. – С. 588-592.
2. Давтян Л.Л., Корытнюк О.Я., Дзюблик І.В., Трохименко О.П. Експериментальне обґрунтування ефективності дії «Віруспену» – лікарських плівок на основі ацикловіру. I. Оптимізація технології «Віруспену» та оцінка його цитотоксичності в культурі клітин: Зб. наук. пр. співр. КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ, 2002. - Вип. 11. – Кн. 3. – С. 216-222.
3. Auclair B., Sirois G., Ngoc AN., Ducarme MP. Novel pharmacokinetics modelling of transdermal nitroglycerin // Pharmaceutical Research. – 1998. – Vol. 15, No. 4. – P. 614-619.
4. Bailer A.J. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques // J. Pharmacokinet. Biopharm. -1988. – Vol. 16, No. 3. - P. 303-309.
5. Benet L.Z., Mitchell J.R., Sheiner L.B. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. - Pergamon, 1990 - 214 p.
6. Cawello W., Antonucci T. The correlation between pharmacodynamics and pharmacokinetics: basics of pharmacokinetics-pharmacodynamics modelling // J. Clin. Pharmacol. - 1997. - Vol. 37. - P. 65S-69S.
7. Levy G. What are narrow therapeutic index drugs? // Clin. Pharmacol. Ther.-1998. - Vol. 63, No. 5. - P. 501-505.

Резюме

Корытнюк Р.С., Давтян Л.Л., Корытнюк А.Я., Середа П.И.

Определение фармакокинетических параметров лекарственных пленок «Віруспен» в крови крыс

Экспериментально определены фармакокинетические параметры лекарственных пленок «Віруспен» в

Таблиця 2

Фармакокінетичні параметри ацикловіру

№ п/п	Фармакокінетичні параметри	Значення параметрів
1	D – доза лікарського препарату, мкг	680
2	D/g – доза лікарського препарату на 1 г маси щура, мкг/г	3.40
3	C_{max} – максимальна концентрація, мкг/мл	0.048
4	C_0 – уявна початкова концентрація діючої речовини, мкг/мл	0.17
5	V_d – об'єм розподілу, мл/г	20
6	$T_{1/2} k_e$ – час напіввиведення препарату на ділянці фармакокінетичної кривої, що характеризує виведення, хв	30
7	$T_{1/2} k_a$ – час напіввиведення препарату на ділянці фармакокінетичної кривої, що характеризує всмоктування, хв	85.8
8	k_e – константа швидкості елімінації препарату, 1/хв	0.023
9	k_a – константа швидкості всмоктування препарату, 1/хв	0.0081
10	t_{max} – час досягнення максимальної концентрації у крові, хв	69.79
11	Cl – кліренс, мл/(хв·г)	0.46
12	Cl 200 – кліренс на 200 г маси щурів, мл/хв	92
13	AUC – площа під фармакокінетичною кривою, мкг·хв/мл	7.39
14	MRT – середній час утримування, хв	43.47
15	AUMC – сумарна площа під фармакокінетичною кривою, мкг·хв/мл	321

крови крыс. Установлены числовые показатели периода полувыведения, клиренса, суммарной площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время», объема распределения, констант скорости всасывания и элиминации и др. Полученные результаты позволяют предположить, что лекарственные пленки «Вируплен» представляют несомненный интерес для терапии герпес-вирусной инфекции.

Summary

Koritnyk R.S., Davtyan L.L., Koritnyk A.Y., Sereda P.I.

Definition of pharmacokinetic parameters of «Viruplen» medicinal films in blood of rats

The pharmacokinetics parameters of «Viruplen» medicinal films in blood of rats have been experimentally studied. The numerical values of excretion half-cycle, clearance, total area under curve «concentration – time», volume of distribution, constants of absorption and elimination rate, etc., have been established.

The results obtained allow to assume, that «Viruplen» medicinal films represent a doubtless interest for therapy of herpes - virus infections.

Коритнюк Раїса Сергіївна. Закінчила фармацевтичний факультет Запорізького медичного

інституту. Працює в КМАПО ім. П.Л. Шупика (із 1967). Зав. кафедри технології ліків та клінічної фармації. Д.фарм.н. (1992). Професор (1994). Академік міжнародної академії інформатизації при ООН (1995).

Давтян Лена Левонівна. Закінчила фарм. факультет Кемеровського державного медичного інституту. Доцент кафедри технології ліків та клінічної фармації КМАПО ім. П.Л. Шупика. К.фарм.н (1996).

Коритнюк Олексій Ярославович. Закінчив стоматологічний факультет Національного медичного університету. Асистент кафедри терапевтичної стоматології КМАПО ім. П.Л. Шупика.

Середа Петро Іванович. Закінчив Київський державний медичний університет. Зав. кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця. Д.мед.н. Професор (1999).

Техніко-економічні та маркетингові дослідження

УДК 338.5:615.2/3

Пивень Е.П., Дихтярев С.И.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Разработка научных подходов к оценке конкурентоспособности технологий производства лекарственных средств

Разработаны методологические и методические подходы к оценке конкурентоспособности технологии производства лекарственных средств. Оценку конкурентоспособности предложено проводить на основе комплексных показателей потребительной стоимости технологического процесса и потребительной стоимости лекарственного средства. Определены основные группы показателей, которые наиболее полно отображают потребительские свойства технологического процесса. Разработана модель формирования конкурентоспособности технологии производства лекарственного средства и алгоритм ее оценки. Для оценки конкурентоспособности технологии производства предложено использовать показатели, которые отображают соотношение экономических выгод производителя и затрат, связанных с приобретением и освоением технологий.

Повышение уровня, качества и конкурентоспособности процессов и технологий — одна из актуальных задач научно-исследовательских организаций по разработке лекарственных средств (ЛС), реализующих свою научно-техническую продукцию (НТП) на рынке. Это связано с тем, что создание новых прогрессивных технологий производства лекарственных средств потенциально позволяет найти для них рынок сбыта не только среди отечественных производителей, но и за рубежом.

Нельзя не согласиться с мнением авторов [1, 2, 4, 9, 10, 11], что оценка конкурентоспособности технологии приносит наибольший коммерческий результат, как правило, при ее

проведении на всех основных стадиях создания НТП, начиная с этапа планирования научно-исследовательской разработки (НИР) и заканчивая наработкой опытно-промышленной серии. Необходимость оценки конкурентоспособности технологии на основных этапах ее создания связана с тем, что в случае получения отрицательного результата в отношении перспективности технологии на всех этапах НИР, возникает необходимость разработки и принятия ряда мер по повышению ее уровня, т.е. усовершенствованию технологических и экономических показателей НТП [10].

Оценка конкурентоспособности технологии производства лекарственного препарата

на стадии его разработки сталкивается со значительными трудностями, в первую очередь, связанными с определенными рисками в отношении ее технических и экономических характеристик. Но именно на этом этапе такая оценка представляет наибольший интерес для разработчика.

Как показал анализ методических подходов, используемых специалистами для оценки и отбора технологий, наряду с экспертными и параметрическими методами оценки конкурентоспособности значительное распространение получили подходы, основанные на применении показателей, имеющих реальное экономическое содержание [1, 5, 10, 11]. При этом коммерческая перспективность технологии обязательно рассматривается в комплексе с оценкой преимуществ продукции, выпускаемой на ее основе. В связи с этим основными критериями оценки технологии производства ЛС являются особенности и преимущества технологических и экономических показателей. Наряду с технико-экономическими преимуществами технологии используется прогноз потребности рынка в соответствующей продукции и уровень экономических выгод, которые может получить производитель. В то же время, методологические подходы к оценке конкурентоспособности технологии производства лекарственных средств на основе их потребительской стоимости в сфере фармацевтического производства отсутствуют.

Целью данной работы является разработка методических подходов к оценке конкурентоспособности технологии производства лекарственных средств на основе показателя потребительской стоимости.

Сущность данного подхода заключается в том, что в основе конкурентоспособности технологии производства ЛС лежит единство стоимости (цена потребления технологии) и его потребительской стоимости. Поэтому для оценки уровня конкурентоспособности технологии производства ЛС, также как и в целом конкурентоспособности самого ЛС, целесообразно использовать комплексный показатель (индекс) потребительской стоимости, рассчитанный на основании групп показателей, которые наиболее полно отражают потребительские свойства технологии, и комплексный показатель потребительской стоимости ЛС [8, 9].

Основным методологическим принципом оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС на основе его потребитель-

ной стоимости является равенство конкурентоспособности технологических процессов (ТП) при одинаковых потребительских, экономических и нормативных показателях.

Если потребительская стоимость ЛС основана на его потребительских свойствах [8, 9], то потребительская стоимость технологии производства ЛС может быть установлена на основе комплексной оценки следующих групп его потребительских свойств, характеризующих соответствующий уровень производства и позволяющих получить продукцию заданного качества (потребительской стоимости) и технического уровня: показатели технологичности, техно- и эко- безопасности, надежности технологии, законодательно-нормативные показатели, защита охраняемыми документами объектов интеллектуальной собственности, показатели экономического эффекта от использования технологии.

Показатели технологичности отражают две взаимосвязанные совокупности характеристик технологического процесса [1]:

- в технологическом аспекте - технологическую рациональность и преемственность решений (применяемость оборудования, процессов и повторяемость технологических приемов);
- в экономическом аспекте – трудоемкость, материалоемкость, энергоемкость, величину потерь и др.

К показателям технологичности необходимо отнести [11, 12, 13]:

- расходные коэффициенты сырья и материалов, используемых в производстве ЛС;
- степень использования основного сырья в производстве ЛС (субстанции или готового ЛС);
- расходные коэффициенты энергоресурсов (электроэнергия, пар, газ и др.);
- степень унификации технологического процесса (оборудования);
- продолжительность технологического цикла;
- технологическая трудоемкость изготовления ЛС (единицы продукции) и др.

Экологические показатели характеризуют уровень вредных воздействий технологического процесса на окружающую среду. При выборе и определении этих показателей учитываются требования охраны окружающей среды конкретной страны. Технология производства ЛС не может быть признана конкурентоспособной на исследуемом рынке, если в результате ее реализации нарушаются установленные государством правила,

нормы и требования к охране окружающей среды, в том числе расходы на их выполнение значительно повышают издержки производства, в результате чего выпуск ЛС становится неконкурентоспособным (нерентабельным).

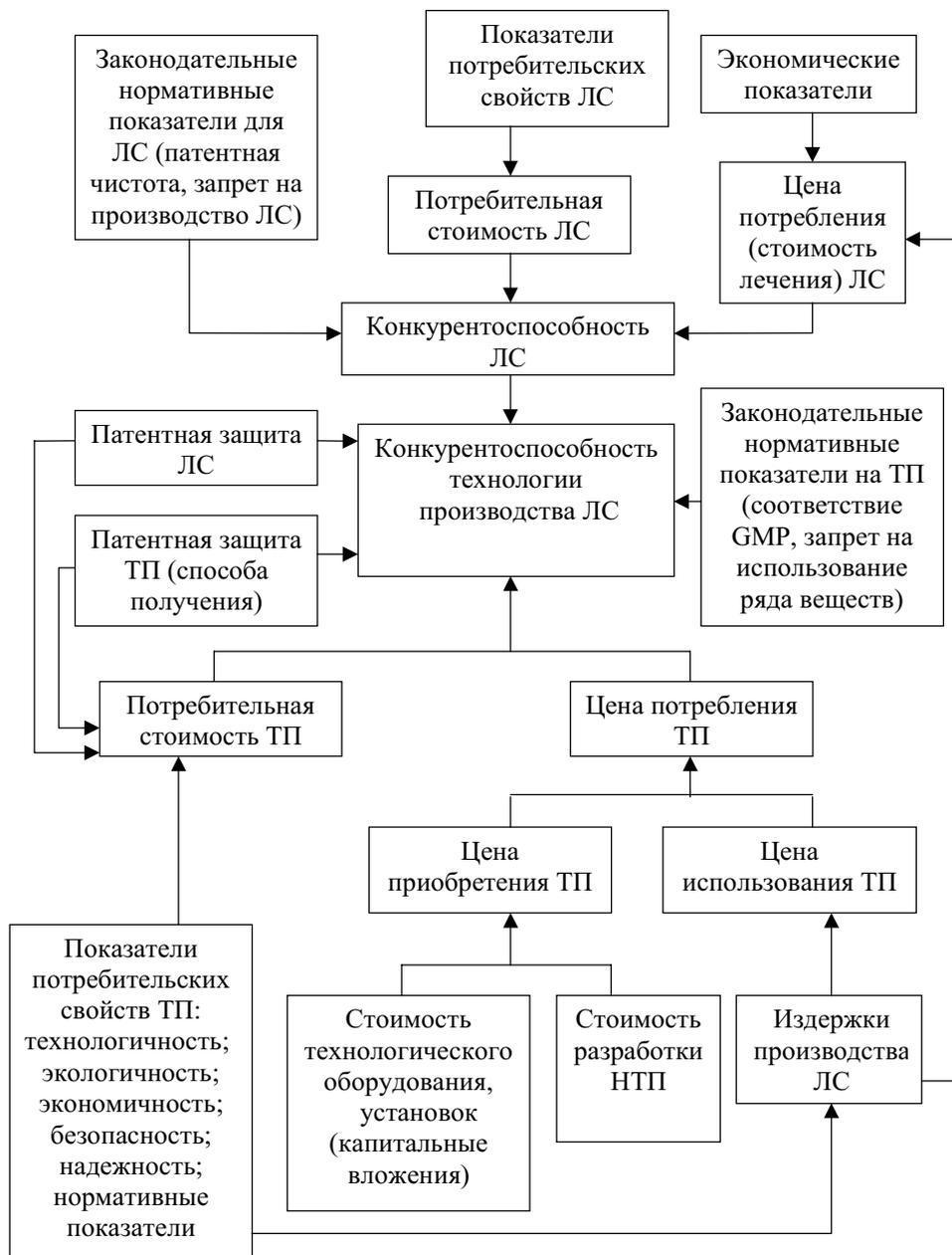
Показатели безопасности основного технологического процесса характеризуют его особенности, обуславливающие безопасность производства лекарственного средства на предприятии.

Показатели надежности технологического процесса характеризуют его особенности, обуславливающие надежность производства лекарственного средства на предприятии.

К законодательно нормативным показателям технологического процесса относится его соответствие требованиям GMP [6, 7, 13].

Исходя из требований, которые предъявляются к разработке, производству и реализации готовых лекарственных средств (ГЛС) в Украине, а также с учетом сферы их при-

Рисунок 1



Модель формирования конкурентоспособности технологии производства лекарственного средства

менения, объектами защиты интеллектуальной собственности охраняемыми документами являются [3]:

- способ получения вещества (субстанции, вспомогательного вещества);
- способ получения ГЛС;
- устройства для получения субстанции, ГЛС;
- методы анализа вещества и ГЛС;
- вещество (биологически активное соединение – субстанция, вспомогательное вещество);
- готовое лекарственное средство (композиция биологически активного соединения и вспомогательных веществ);
- защита наименования лекарственного средства знаком для товаров и услуг;
- защита внешнего вида лекарственного средства промышленным образцом (лекарственная форма, упаковка).

Показатели прогнозируемого экономического эффекта характеризуют экономические выгоды, которые производитель потенциально может получить в результате организации производства лекарственного средства, и уровень окупаемости расходов производителя (лицензиата) на приобретение (разработку) и освоение технологического процесса.

Так как конкурентоспособность технологии получения ЛС, как комплексный показатель, является рыночной категорией, ее уровень определяется не только техническими и экономическими характеристиками самой технологии, но зависит и от величины спроса на выпускаемую продукцию. В результате конкурентоспособность технологии производства лекарственного средства формируется под воздействием значительного количества факторов, основные из которых представлены на Рис. 1. На основании анализа этих факторов разработана модель формирования конкурентоспособности технологии производства ЛС.

Для оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС, основанной на отношении потребительной стоимости технологического процесса и потребительной стоимости лекарственного средства к цене потребления технологии (для производителя) и к цене потребления ЛС, выбираются показатели как для конечных продуктов (ГЛС, субстанций), так и для технологии. Данная зависимость может быть описана следующей функцией:

$$K_{ТП} = I_{НТП} \cdot I_{ТП} \cdot I_{ЦП}^{-1} \cdot I_{НОРМ} \cdot I \cdot I_{ЭКОН}^{-1}, \quad (1)$$

где:

- $K_{ТП}$ – конкурентоспособность оцениваемой технологии производства ЛС по сравнению с базисной;
- $I_{НТП}$ – индекс нормативных показателей, характеризующих соответствие технологии правилам, стандартам и нормам, принятым в стране (принимается значение 0 или 1);
- $I_{ТП}$ – индекс потребительной стоимости оцениваемой технологии по сравнению с базисной;
- $I_{ЦП}$ – индекс цены потребления оцениваемой технологии для производителя по отношению к базисной;
- $I_{НОРМ}$ – индекс нормативных показателей, характеризующих соответствует ли ЛС стандартам и нормам, принятым в стране (может принимать только значение 0 или 1);
- I – индекс потребительной стоимости ЛС к базисному ЛС;
- $I_{ЭКОН}$ – индекс экономических показателей ЛС к базисному ЛС.

Индекс нормативных показателей технологии производства ЛС рассчитывается по формуле:

$$I_{НТП} = \prod_{q=1}^c S_{\alpha q}, \quad (2)$$

где:

- $S_{\alpha q}$ – абсолютные значения, характеризующие q -й нормативный показатель исследуемой α технологии.

Индекс потребительной стоимости технологии производства ЛС рассчитывается по формуле:

$$I_{ТП} = \sum_{z=1}^u \left(\frac{t_{\alpha z}}{t_{Bz}} \right)^{\pm 1} \cdot V_z, \quad (3)$$

где:

- $t_{\alpha z}$ и t_{Bz} – абсолютные значения, характеризующие z -е потребительское свойство оцениваемой (α) и базисной (B) технологии производства ЛС, соответственно;
- V_z – коэффициент весомости z -го потребительского свойства;
- u – количество рассматриваемых параметров (потребительских свойств) технологии производства ЛС;

± 1 — показатель степени, который показывает направление улучшения параметра:

- + 1, если показатель максимизируется;
- 1, если показатель минимизируется.

$$\sum_{z=1}^u (V_z) = const.$$

Индекс цены потребления технологии для производителя относительно базисной определяется по формуле:

$$I_{ЦП} = \frac{Ц_{Па}}{Ц_{ПБ}}, \quad (4)$$

где:

- $Ц_{Па}$ — цена потребления оцениваемой технологии производства ЛС;
- $Ц_{ПБ}$ — цена потребления базисной технологии производства ЛС;
- $I_{НОРМ.}$, I и $I_{ЭКОН.}$ рассчитываются в соответствии с разработанной методикой, приведенной в [9].

Формальное выражение определения конкурентоспособности технологии производ-

ства лекарственного средства (1) в развернутом виде может быть представлено функцией:

$$K_{ТП} = \prod_{q=1}^c S_{\alpha q} \cdot \left[\sum_{z=1}^u \left(\frac{t_{\alpha z}}{t_{Бz}} \right)^{\pm 1} \cdot V_z \right] \cdot \frac{Ц_{ПБ}}{Ц_{Па}} \cdot \prod_{g=1}^n H_{ig} \cdot \frac{\sum_{j=1}^m \left(\frac{P_{ij}}{P_{Эj}} \right)^{\pm 1} \cdot M_j}{\sum_{j=1}^m \left(\frac{P_{Бj}}{P_{Эj}} \right)^{\pm 1} \cdot M_j} \cdot \frac{C_B}{C_i}, \quad (5)$$

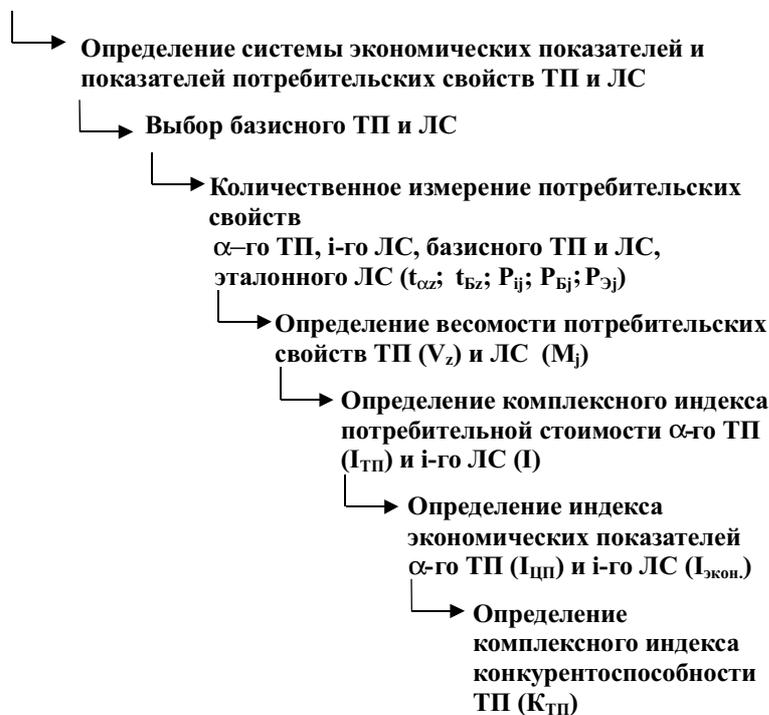
где:

- P_{ij} , $P_{Бj}$ и $P_{Эj}$ — абсолютные значения, характеризующие j -е потребительское свойство оцениваемого i -го, базисного и эталонного ЛС, соответственно;
- M_j — коэффициент весомости j -го потребительского свойства;
- m — количество параметров (потребительских свойств) ЛС.

При $K_{ТП} > 1$ технология производства ЛС является конкурентоспособной на рассматриваемом рынке по отношению к базисной.

Рисунок 2

Оценка принципиальной возможности конкурентоспособности ТП и ЛС по нормативным показателям ($I_{ТП}$; $I_{НОРМ.}$)



Обобщенный алгоритм оценки конкурентоспособности технологии производства лекарственного средства на основе потребительской стоимости

Обобщенный алгоритм оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС на основе потребительской стоимости представлен на Рис. 2.

Показателями технологии производства ЛС, характеризующими цену ее потребления, являются:

- стоимость разработки НТП;
- капитальные вложения для внедрения и освоения технологии;
- издержки эксплуатации ТП.

В качестве базисной выбирается аналогичная технология производства ЛС, реально существующего на рынке, потребительские свойства которого максимально приближены к лекарственному средству, произведенному по оцениваемой технологии.

Возможен также вариант закупки лицензии на технологию. Если стоимость лицензии (НТП) на технологию, выбранную в качестве базисной, не известна, то в расчетах используются только показатели, характеризующие капитальные затраты на приобретение технологического оборудования, установок и эксплуатационные издержки ТП.

В условиях, когда технологии оцениваемого процесса и базисного (аналога) – различные, а лекарственные средства, получаемые на их основе, одинаковые по качеству, терапевтической эффективности (потребительской стоимости), оценка конкурентоспособности ТП осуществляется только по экономическим показателям (цена потребления, издержки производства, отдельные статьи затрат на производство и др.). Если технологии и получаемые на их основе ЛС, например, субстанции оцениваемого процесса и аналога различаются по показателям потребительской стоимости, то определение конкурентоспособности осуществляется по (1). В этом случае выбираются показатели, характеризующие потребительскую стоимость технологий и ЛС (конечных продуктов) оцениваемого процесса и базисного, а также экономические показатели этих процессов.

Если оценка конкурентоспособности осуществляется в отношении отдельных стадий ТП, которые применяются в производстве различных ЛС, то сопоставляются показатели только самого технологического процесса. В этом случае зависимость принимает следующее выражение:

$$K_{ТП} = I_{НТП} \cdot I_{ТП} \cdot I_{ЦП}^{-1} \quad (6)$$

Предприятия-производители при организации производства ЛС заинтересованы ре-

ализовывать продукцию по ценам, которые с учетом эластичности спроса на рынке обеспечивают максимальную прибыль при минимальных затратах на ее изготовление. Поэтому потенциальный лицензиат предпочтет тот технологический процесс, который обеспечит ему наибольшие экономические выгоды при наименьших издержках производства.

В связи с изложенным, наиболее адекватно уровень конкурентоспособности технологии производства ЛС может быть выражен через соотношение экономических выгод потенциального производителя и затрат, связанных с приобретением и освоением технологии. Поэтому для оценки конкурентоспособности целесообразно использовать показатель окупаемости затрат, величину, обратную окупаемости затрат (уровень прибыли, приходящийся на единицу затрат), или величину расходов, связанных с производством продукции по сравниваемым технологиям. Выбор экономического показателя, на основании которого предполагается провести оценку конкурентоспособности технологии, зависит от объекта исследования, условий, сложившихся на рынке, и доступного информационного материала.

Расчет конкурентоспособности технологии производства лекарственного средства в соответствии с выбранными экономическими показателями проводится по формуле:

$$K_{ТП} = \left(\frac{\mathcal{E}_{П\alpha}}{\mathcal{E}_{ПБ}} \right)^{\pm 1}, \quad (7)$$

где:

$\mathcal{E}_{П\alpha}$, $\mathcal{E}_{ПБ}$ – экономический показатель оцениваемой α и базисной технологии производства ЛС, соответственно.

В соответствии с предложенной методикой оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС, анализ конъюнктуры рынка проводится на основании результатов исследований состояния и тенденций развития соответствующих рынков технологий и лекарственной продукции. В результате обобщения информации, характеризующей технико-экономические показатели технологий, наличие соответствующих производственных мощностей, величину спроса на препараты-аналоги, уровень их потребительских свойств, уровень цен, определяется, какой же из технологических процессов может быть выбран в качестве базы для сравнения. Достигнутый или прогнозируемый уровень исследуемой технологии оценивается, исхо-

для из основных технических и нормативных показателей. При этом обеспечивается условие сопоставимости показателей исследуемого и базисного технологических процессов.

Выбор методов оценки конкурентоспособности технологии зависит от конкретных условий и доступной информационной базы, обеспечивающей сопоставимость показателей сравниваемых технологических процессов.

Выводы

1. Основными критериями оценки технологии производства ЛС являются преимущества в отношении технических и экономических показателей, характеризующих как саму технологию, так и лекарственные средства, получаемые на ее основе.

2. Для оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС целесообразно использовать комплексные показатели потребительской стоимости этой технологии и потребительской стоимости ЛС, которые рассчитываются на основании основных групп показателей, наиболее полно отражающие потребительские свойства ТП и ЛС.

3. Основным методологическим принципом оценки конкурентоспособности технологии производства ЛС на основе его потребительской стоимости является равенство конкурентоспособности ТП при одинаковых потребительских, экономических и нормативных показателях.

4. Оценку конкурентоспособности технологии производства ЛС целесообразно также проводить на основе показателей, отражающих соотношение экономических выгод производителя и затрат, связанных с приобретением и освоением технологии.

5. Выбор методов оценки конкурентоспособности технологии зависит от объекта исследования, условий, сложившихся на рынке, и доступной информационной базы, обеспечивающей сопоставимость показателей сравниваемых технологических процессов.

6. Предложенная методика позволяет объективно проводить оценку конкурентоспособности разрабатываемой технологии производства ЛС, оценить перспективность закладываемых технических и экономических показателей будущего способа получения соответствующего ЛС еще на стадии поисковых исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дитер И.Г. Технологический маркетинг. – М.: Янус К, 2002. – 478 с.

2. Васейко Л.В. Особенности оценки конкурентоспособности процессов и продуктов нефтепереработки и нефтехимии // Вопросы изобретательства. - 1987. - № 6. - С. 41-45.

3. Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Маслова Н.Ф., Пивень Е.П., Стандара В.М. Защита прав интеллектуальной собственности в области создания лекарственных средств. // Фармаком. - 2002. - № 2. - С. 67-70.

4. Михайлова Е.А. Бенчмаркинг. – М.: ООО Фирма «Благовест-В», 2002. – 176 с.

5. Медведков С.Ю., Сергеев Ю.А. Международный маркетинг американской технологии. - М.: Наука, 1995. – 191 с.

6. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – К.: МОРИОН, 1999. – 896 с.

7. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – К.: МОРИОН, 2001. – 472 с.

8. Пивень О.П. Методологічні підходи до ціноутворення на лікарські засоби з урахуванням їх споживчої вартості та фармакоекономічних принципів // Фармацевтичний журн. - 2004. - № 1.

9. Пивень Е.П. Разработка научных подходов к оценке конкурентоспособности лекарственных средств на основе потребительской стоимости и фармакоэкономических принципов // Фармаком, 2003. - № 4. - С. 50-57.

10. Пивень Е.Г., Белянкина Н.И. Конкурентоспособна ли разработка на внешнем рынке // Патенты и лицензии. - 1992. - № 3-4. - С. 28-30.

11. Сергеев Ю.А. США: международный технологический бизнес. - М.: Международные отношения, 1989. - 208 с.

12. Україна. ГНД 09-001-98. Регламенти виробництва лікарських засобів: зміст, порядок розробки, узгодження та затвердження. Наказ Державного комітету України з медичної та мікробіологічної промисловості від 27 травня 1998 року № 65. - Київ, 1998. - 77 с.

13. Україна. Настанова 42-01-2003. Лікарські засоби. Технологічний процес. Документація / ДП ДНЦЛЗ, МОЗ України. – Київ, ТОВ "МОРИОН". – 42 с.

Резюме

Пивень О.П., Діхтярьов С.І.

Розробка наукових підходів до оцінки конкурентоспроможності технологій виробництва лікарських засобів

Розроблено методологічні та методичні підходи до оцінки конкурентоспроможності технологій виробництва лікарських засобів. Оцінку конкурентоспроможності запропоновано проводити на основі комплексних показників споживчої вартості технологічного процесу і споживчої вартості лікарського засобу. Визначені основні групи показників, які найбільш повно відображають споживчі якості технологічного процесу. Розроблена модель формування конкурентоспроможності технологій виробництва лікарського засобу й алгоритм її оцінки. Для оцінки конкурентоспроможності технологій виробництва лікарського засобу запропоновано використовувати показники, які відображають співвідношення економічних вигод виробника та витрат, пов'язаних із придбанням та освоєнням технології.

Summary

Piven E.P., Dikhtyaryov S.I.

Development of scientific approaches to evaluation of competitiveness of drug production technologies

The methodological and methodical approaches to evaluation of competitiveness of drug production technology have been developed. It has been proposed to perform the competitiveness evaluation on basis of complex indices of the technological process use value and the drug value in use. The main groups of indices reflecting the consumer characteristics of technological process most completely were determined. A model of forming of drug production technology competitiveness, as well as an algorithm of evaluation of one, were developed. It was proposed to use the indices, reflecting the ratio of economical benefits of producer and the costs concerned with acquisition

and conversion of technologies, for evaluation of production technology competitiveness.

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

Дихтярев Сергей Иванович (р. 1951). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1973). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1975). Зам. директора по научной работе (1990). Зав. лабораторией химии и технологии биополимеров (1995). Д. фарм. н. (1992). Профессор (2002).