

# ДЕРЖАВНА ФАРМАКОПЕЯ УКРАЇНИ

перше видання

## ДОПОВНЕННЯ 4

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Державна служба України з лікарських засобів

# ДЕРЖАВНА ФАРМАКОПЕЯ УКРАЇНИ

перше видання

## ДОПОВНЕННЯ 4

*Введено в дію з 1 травня 2011 року  
наказом Міністерства охорони здоров'я України  
від 23 березня 2011 року № 162*

*Розроблено Державним підприємством  
«Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів»  
на підставі Європейської Фармакопеї*

Харків  
2011

ББК 35.66  
УДК 615.45  
ДЗ6

**ДЗ6** Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 1-е вид. — Доповнення 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — 540 с.  
ISBN 978-966-96478-6-3

ISBN 978-966-96478-6-3



© Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011

У цьому році Україна святкує двадцяту річницю своєї незалежності. Тому особливо приємно привітати фармацевтичну та медичну громадськість із виходом Доповнення 4 до Державної Фармакопеї України 1-го видання. Цей подарунок до ювілею нашої держави є вже п'ятим томом Фармакопеї, що святкує у цьому році десяту річницю свого створення та введення в дію.

Стратегічним напрямком розвитку національної системи забезпечення і контролю якості лікарських засобів в Україні є всебічне запровадження Належних практик, передусім, виробничої та дистриб'юторської. Належні практики забезпечують, зокрема, виконання державного стандарту якості лікарських засобів, яким є Державна Фармакопея України.

Державна Фармакопея України у цьому році святкує своє десятиріччя. За цей час вона стала наризним каменем усієї системи сертифікації лікарських засобів у нашій державі й основою державного контролю їх якості.

Державна Фармакопея України гармонізована з Європейською Фармакопеєю та встановлює в Україні європейські стандарти якості ліків.

Кожний том Державної Фармакопеї України має свої особливості. Характерною особливістю Доповнення 4 є те, що воно розроблено у співробітництві не тільки з Європейською Фармакопеєю, але і з Фармакопеєю США. Це є важливим кроком до інтеграції України до світового фармацевтичного ринку, що набирає особливу значущість у зв'язку зі вступом України до Світової Організації Торгівлі.

Щиро вітаємо фармацевтичну громадськість із виданням Доповнення 4 до Державної Фармакопеї України.

**Голова Державної служби України  
з лікарських засобів**



**Олексій Саловіов**



## Шановні колеги!

Вашій увазі пропонується Доповнення 4 до Державної Фармакопеї України 1 видання (ДФУ 1.4), що підготоване Державним підприємством «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (далі Фармакопейний центр) відповідно до *Наказу Міністра охорони здоров'я № 95 від 12.03.2001.*

Основне завдання Державної Фармакопеї України (ДФУ) – сприяння встановленню в Україні європейських стандартів якості лікарських засобів та інтеграції України до світового фармацевтичного ринку. ДФУ розроблена на підставі Європейської Фармакопеї (ЄФ) та повністю з нею гармонізована. ЄФ постійно підвищує рівень вимог до якості лікарських засобів, видаючи Доповнення до діючого видання. Із метою подальшої гармонізації з ЄФ та введення нових текстів Фармакопейний центр видає Доповнення до ДФУ. Ці Доповнення також узагальнюють досвід, що ми набуваємо, використовуючи ДФУ у повсякденній роботі.

Щоб відповідати вимогам сучасного фармацевтичного виробництва, що динамічно розвивається, ДФУ постійно вдосконалюється та розширює сферу свого впровадження.

Так, ДФУ 1.4 запроваджує значний блок статей із контролю якості біологічних препаратів, зокрема монографії на інсуліни (13 статей), інтерферони (3 статті), а також понад 50 статей на моновакцини календарного плану щеплення, імуносироватки та методи їх контролю. Введення цих статей до ДФУ дозволяє встановити європейський рівень вимог до якості імунобіологічних препаратів як вітчизняного виробництва, так і імпортованих в Україну.

Стратегічним напрямком подальшого розвитку ДФУ залишається розробка монографій на готові лікарські засоби (ГЛЗ), що у ДФУ 1.4 набула нового якісного рівня. До ДФУ 1.4 введено понад 40 монографій на ГЛЗ. Значну частину монографій на ГЛЗ ДФУ 1.4 розроблено на підставі відповідних монографій Фармакопеї Сполучених Штатів Америки. Зважаючи на це, до деяких загальних статей наведено необхідні доповнення. Ці роботи проводяться згідно з *Угодою між Фармакопеєю США і Фармакопейним центром від 2.10.2010 року.* Ми щиро вдячні адміністрації Фармакопеї США за надану допомогу і сподіваємося на подальше плідне співробітництво.

Продовжується введення до ДФУ монографій на лікарську рослинну сировину (ЛРС). До ДФУ 1.4 введено 49 нових і переглянутих монографій на ЛРС разом із блоком відповідних загальних статей із методів фармакогнозії, в яких поряд із європейськими вимогами, враховано реальний стан вітчизняного ринку даних лікарських засобів. Серед таких загальних статей слід відзначити статтю 2.8.20, присвячену відбору проб і пробопідготовці лікарської рослинної сировини. Важливим є введення до ДФУ монографій на настойки. У перспективі передбачається значну частину ЛРС, що знаходиться на фармацевтичному ринку України, контролювати за монографіями ДФУ. Все це дозволить вивести контроль якості ЛРС зі сфери дії Державної Фармакопеї СРСР XI видання та гармонізувати вимоги до неї зі світовою фармацевтичною практикою.

Працюючи над розвитком та удосконаленням ДФУ, Фармакопейний центр відзначає, що Державна Фармакопея України є результатом спільної праці науковців, передових виробників лікарських засобів та широкої фармацевтичної громадськості.

Державна Фармакопея України – відкрита трибуна для обговорення та запровадження важливих для суспільства вимог до якості ліків. Фармакопейний центр уважно вивчає всі пропозиції, що надходять, і використовує їх, вдосконалюючи фармакопейні тексти. Найважливіші статті й інші матеріали ДФУ публікуються у журналі «Фармаком» та розміщуються на сайті Фармакопейного центру [www.sphu.org](http://www.sphu.org) для обговорення фармацевтичною громадськістю.

Фармакопейний центр щиро дякує за співпрацю та запрошує усіх до подальшої роботи над вдосконаленням Державної Фармакопеї України.

Директор Державного підприємства  
«Український науковий фармакопейний центр  
якості лікарських засобів»



професор О.І. Гризодуб



# ЗМІСТ

II.	<i>СЕКРЕТАРІАТ РЕДАКЦІЙНОЇ КОЛЕГІЇ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ</i> .....	17
III.	<i>ВІДПОВІДАЛЬНІ ОСОБИ</i> .....	19
IV.	<i>ОРГАНІЗАЦІЇ ТА УСТАНОВИ УКРАЇНИ, ЩО БРАЛИ УЧАСТЬ У РОЗРОБЦІ ДОПОВНЕННЯ 4 ДО ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ І ВИДАННЯ</i> .....	21
VI.	<i>ВСТУП</i> .....	25
VII.	<i>ДОДАТКИ ДО ДІЮЧИХ ТЕКСТІВ ДФУ</i> .....	27
2.	<b>МЕТОДИ АНАЛІЗУ</b> .....	35
2.1.	<i>ОБЛАДНАННЯ</i> .....	35
2.1.3.	Ультрафіолетові лампи для аналітичних цілей .....	35
2.1.6.	Індикаторні трубки .....	35
2.2.	<i>ФІЗИЧНІ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ</i> .....	37
*2.2.1.	Визначення прозорості і ступеня каламутності рідин .....	37
*2.2.20.	Потенціометричне титрування .....	39
*2.2.32.	Втрата в масі при висушуванні .....	39
*2.2.34.	Термічний аналіз .....	40
2.2.41.	Круговий дихроїзм .....	43
*2.2.42.	Густина твердих речовин .....	45
2.2.48.	Раманівська спектроскопія .....	46
2.2.49.	Вимірювання в'язкості на віскозиметрі з падаючою кулькою .....	48
2.2.54.	Ізоелектрофокусування .....	48
2.2.55.	Пептидне картування.....	51
2.4.	<i>ВИПРОБУВАННЯ НА ГРАНИЧНИЙ ВМІСТ ДОМІШОК</i> .....	56
*2.4.8.	Важкі метали.....	56
*2.4.14.	Сульфатна зола .....	60
2.5.	<i>МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ</i> .....	61
*2.5.24.	Діоксид вуглецю в газах .....	61
*2.5.25.	Оксид вуглецю в газах .....	61
2.5.31.	Рибоза в полісахаридних вакцинах .....	62
2.5.33.	Загальний білок .....	62
2.5.34.	Оцтова кислота в синтетичних пептидах .....	67
2.5.35.	Закис азоту у газах .....	67
2.5.36.	Анізидинове число .....	68
2.6.	<i>БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ</i> .....	69
*2.6.1.	Стерильність .....	69
2.6.2.	Мікобактерії .....	74
*2.6.9.	Аномальна токсичність .....	74
2.6.10.	Гістамін .....	75
*2.6.12.	Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів.....	76
*2.6.13.	Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів .....	84
*2.6.14.	Бактеріальні ендотоксини .....	94
2.6.16.	Випробування на сторонні агенти у вірусних вакцинах для застосування людиною .....	100
2.6.18.	Випробування живих вірусних вакцин на нейровірулентність .....	102



2.6.19.	Випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної).....	103
2.6.21.	Методи ампліфікації нуклеїнових кислот.....	105
2.6.31.	Випробування мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів для орального застосування .....	111
2.7.	<b>БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ</b> .....	116
*2.7.2.	Кількісне визначення антибіотиків мікробіологічним методом .....	116
2.7.5.	Кількісне визначення гепарину.....	127
2.7.6.	Кількісне визначення вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої).....	128
2.7.7.	Кількісне визначення вакцини для профілактики кашлюку (цільноклітинної) .....	135
2.7.8.	Кількісне визначення вакцини для профілактики правця (адсорбованої).....	136
2.7.14.	Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту А.....	142
2.7.15.	Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК).....	142
2.7.24.	Проточна цитометрія .....	143
2.7.27.	Значення флокуляції (Lf) дифтерійного, протиправцевого токсинів та анатоксинів (кількісне визначення за Рамоном/проба Рамона) .....	146
2.8.	<b>МЕТОДИ ФАРМАКОГНОЗІЇ</b> .....	148
2.8.18.	Визначення афлатоксину В <sub>1</sub> у лікарській рослинній сировині.....	148
2.8.20.	Лікарська рослинна сировина: відбір проб і пробопідготовка.....	150
2.8.23.	Мікроскопічне дослідження лікарської рослинної сировини .....	151
2.9.	<b>ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ</b> .....	154
2.9.33.	Характеризація кристалічних і частково кристалічних твердих речовин методом рентгенівської дифракції порошку (РДП).....	154
2.9.41.	Крихкість гранул і сферодів.....	160
2.9.45.	Змочуваність пористих твердих речовин і порошків.....	162
5.1.	<b>ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ З МІКРОБІОЛОГІЇ</b> .....	169
*5.1.3.	Ефективність антимікробних консервантів.....	169
*5.1.4.	Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів.....	171
*5.1.5.	Застосування концепції F <sub>0</sub> при паровій стерилізації водних лікарських засобів .....	172
5.1.8.	Мікробіологічна чистота рослинних лікарських засобів для орального застосування .....	173
5.1.9.	Рекомендації щодо застосування випробування на стерильність .....	174
5.1.10.	Рекомендації щодо застосування випробування на бактеріальні ендотоксини .....	174
5.2.	<b>ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ НА БІОЛОГІЧНІ ПРОДУКТИ</b> .....	180
5.2.2.	Курячі зграї, вільні від специфічних патогенів, для виробництва та контролю якості вакцин.....	180
5.2.3.	Клітинні субстрати для виробництва вакцин для застосування людиною .....	183
5.2.4.	Культури клітин для виробництва вакцин для застосування у ветеринарії .....	187
5.2.5.	Субстанції тваринного походження для виробництва імунологічних лікарських засобів для застосування у ветеринарії .....	190
5.2.6.	Визначення безпеки вакцин та імуносироваток для застосування у ветеринарії .....	192
5.2.7.	Визначення ефективності вакцин та імуносироваток для застосування у ветеринарії.....	194
5.2.9.	Визначення безпеки кожної партії вакцин імуносироваток для застосування у ветеринарії .....	195
5.6.	<b>КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ</b> .....	198
5.14.	<b>ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, ПЕРЕНОСНИКИ ГЕНІВ, ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ</b> .....	202
5.N.1.	<b>ЕКСТЕМПОРАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ</b> .....	221
5.N.1.4.	Порошки екстемпоральні .....	221

## 6. ЗАГАЛЬНІ МОНОГРАФІЇ

*Лікарська рослинна сировина .....	225
------------------------------------	-----

## МОНОГРАФІЇ НА ВАКЦИНИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована, адсорбована).....	229
Вакцина для профілактики гепатиту В (рДНК).....	231
Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована) .....	233
Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована) .....	233
Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована) .....	234
Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена).....	236
Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована) .....	238
Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена(-ів)) .....	239
Вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку (цільноклітинна), (адсорбована) .....	241
Вакцина для профілактики інфекцій, викликаних <i>Haemophilus Influenzae</i> типу b (кон'югована).....	243
Вакцина для профілактики кашлюку (цільноклітинна, адсорбована) .....	247
Вакцина для профілактики кору (жива).....	249
Вакцина для профілактики кору, паротиту та краснухи (жива).....	252
Вакцина для профілактики краснухи (жива) .....	253
Вакцина для профілактики паротиту (жива) .....	256
Вакцина для профілактики поліомієліту (інактивована) .....	258
Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна) .....	262
Вакцина для профілактики правця (адсорбована) .....	269

## МОНОГРАФІЇ НА ІМУНОСИРОВАТКИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Імуносироватка проти отрути гадюки європейської .....	275
Сироватка протиботулінічна .....	276
Сироватка протигангренозна (novyi).....	277
Сироватка протигангренозна (perfringens).....	278
Сироватка протигангренозна (septicum) .....	279
Сироватка протигангренозна, змішана.....	280
Сироватка протидифтерійна .....	281
Сироватка протиправцева .....	282

## МОНОГРАФІЇ НА ЛІКАРЬСКУ РОСЛИННУ СИРОВИНУ

Арніки квітки .....	287
Арніки настойка .....	289
Артишоку листя .....	291
Беладонни листя настойка стандартизована .....	293
Берези листя .....	295
Буркун .....	296
Вербени трава .....	299
Вітекса священного плоди .....	301
Гамамелісу листя .....	303
Гідрастису канадського кореневища .....	304
Дуба кора.....	306
Дурману листя.....	307
Зірчастий аніс .....	310
Імбир .....	311
Каскара .....	313
Кола.....	315
Коричник .....	316
Коричника настойка .....	318
Коріандр.....	318
Крушини кора.....	320

Куркума яванська .....	322
Ламінарії слані <sup>N</sup> .....	323
*Материнки трава <sup>N</sup> .....	324
Мирра .....	325
Мирри настойка .....	326
Мучниці листя .....	327
*Нагідок квітки .....	329
Нагідок настойка <sup>N</sup> .....	332
Наперстянки листя .....	333
Перстач прямостоячий .....	334
Перстачу прямостоячого настойка .....	336
*Подорожника великого листя <sup>N</sup> .....	337
Полин гіркий .....	339
Померанцю гіркого екзокарпій і мезокарпій .....	341
Приворотень .....	342
Ратанії корені .....	343
Ратанії настойка .....	344
Римської ромашки квітки .....	345
Розторопші плоди .....	346
Рускус шипуватий .....	349
Стручковий перець .....	351
Стручкового перцю настойка .....	352
Тирлича корені .....	354
Тирлича настойка .....	355
Хінного дерева кора .....	356
Центела .....	358
Цитронелова олія .....	359
Шавлії листя .....	360
Шавлії настойка .....	361

## МОНОГРАФІЇ

Амітриптиліну гідрохлорид .....	365
Амоксицилін натрію .....	367
Ампіцилін безводний .....	370
*Ампіцилін натрію .....	373
Атенолол .....	377
Вазелін .....	381
*Вода високоочищена .....	382
*Вода для ін'єкцій .....	385
*Вода очищена .....	389
*Гепарин кальцію .....	393
*Гепарин натрію .....	396
*Гепарини низькомолекулярні .....	399
*Дипіридамол .....	403
Інсулін аспартат .....	405
Інсулін бичачий .....	408
Інсулін двофазовий для ін'єкцій .....	411
Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій .....	411
Інсулін ізофановий для ін'єкцій .....	412
Інсулін лізпро .....	412
Інсулін людський .....	416
Інсулін розчинний для ін'єкцій .....	419
Інсулін свинячий .....	420
Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій .....	423
Інсуліну цинкова суспензія (аморфна) для ін'єкцій .....	427
Інсуліну цинкова суспензія (кристалічна) для ін'єкцій .....	427
Інсуліну цинкова суспензія для ін'єкцій .....	428
Інтерферону альфа-2 розчин концентрований .....	429
Інтерферону бета-1a розчин концентрований .....	433
Інтерферону гамма-1b розчин концентрований .....	436

*Каптоприл .....	443
*Клонідину гідрохлорид .....	446
*Лідокаїну гідрохлорид .....	449
Повітря медичне .....	453
Хлорамфенікол натрію сукцинат .....	457
Цефрадин .....	459

## **N** **МОНОГРАФІЇ НА ГОТОВІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ**

Амброксолу таблетки .....	465
Амітриптиліну таблетки, вкриті оболонкою .....	466
Амоксициліну капсули .....	468
Амоксициліну порошок для ін'єкцій .....	469
Амоксициліну порошок для оральної суспензії .....	471
Амоксициліну таблетки .....	472
Ампіциліну капсули .....	473
Ампіциліну порошок для ін'єкцій .....	474
Ампіциліну порошок для оральної суспензії .....	476
Ампіциліну таблетки .....	477
Бромгексину таблетки .....	478
Дипіридамолу таблетки, вкриті оболонкою .....	480
Ібупрофену таблетки, вкриті оболонкою .....	481
Кальцію глюконату таблетки .....	483
Каптоприлу таблетки .....	484
Карбамазепіну таблетки .....	485
*Кислоти аскорбінової розчин для ін'єкцій, 50 мг/мл .....	487
Кислоти аскорбінової таблетки .....	488
*Клопідогрелю таблетки .....	488
Лідокаїну розчин для ін'єкцій .....	491
Метронідазолу гель .....	492
Метронідазолу капсули .....	493
Метронідазолу песарії .....	494
Метронідазолу розчин для інфузій .....	495
Метронідазолу таблетки .....	496
Напроксену таблетки .....	498
Ністатину мазь .....	499
Ністатину таблетки, вкриті оболонкою .....	499
Оксазепаму таблетки .....	500
Парацетамолу капсули .....	501
*Піразинаміду таблетки .....	503
Ранітидину таблетки, вкриті оболонкою .....	504
Ранітидину розчин для ін'єкцій .....	505
Флуоксетину капсули .....	507
Хлорамфеніколу капсули .....	508
Хлорамфеніколу таблетки .....	509
Хлорамфеніколу краплі очні, розчин .....	511
Хлорамфеніколу краплі вушні, розчин .....	512
Хлорамфеніколу порошок для крапель очних .....	513
Хлорамфеніколу мазь очна .....	513
Хлорамфеніколу крем .....	514
Хлорамфеніколу натрію сукцинату порошок для ін'єкцій .....	515
Хлорпромазину таблетки, вкриті оболонкою .....	516
Ципрофлоксацину таблетки .....	517

## II. СЕКРЕТАРІАТ РЕДАКЦІЙНОЇ КОЛЕГІЇ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ

**Терно Ірина Станіславівна**

керівник наукового напрямку «Загальні статті на методи аналізу», кандидат хімічних наук

**Тихоненко Тетяна Михайлівна**

керівник наукового напрямку «Монографії на лікарські субстанції»

**Товмасян Єрануї Карапетівна**

керівник наукових напрямків «Загальні статті на лікарські форми та фармако-технологічні тести» і «Загальні статті та монографії на біологічні продукти», кандидат біологічних наук

**Крупа Наталія Олександрівна**

керівник наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»

**Чікалова Світлана Олегівна**

керівник наукових напрямків «Реактиви» та «Матеріали та контейнери»

**Кишинєць Неля Віталіївна**

старший науковий співробітник із наукового напрямку «Загальні статті та монографії на біологічні продукти»

**Котова Еліна Едуардівна**

старший науковий співробітник відділу «Валідація та стандартні зразки» та із наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина», кандидат фармацевтичних наук

**Матвієнко Тетяна Микитівна**

головний фахівець із наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»

**Юдіна Ірина Іванівна**

головний фахівець із наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»

**Дмитрієва Марина Василівна**

старший науковий співробітник відділу «Валідація та стандартні зразки», кандидат фармацевтичних наук

**Денисенко Наталія Василівна**

науковий співробітник відділу «Валідація та стандартні зразки»

**Комарова Юлія Анатоліївна**

науковий співробітник відділу «Валідація та стандартні зразки»

**Грунєнко Яна Анатоліївна**

старший лаборант із наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина»



### ІІІ. ВІДПОВІДАЛЬНІ ОСОБИ

Гризодуб Олександр Іванович	загальне та наукове керівництво директор Фармакопейного центру, доктор хімічних наук, професор
Леонт'єв Дмитро Анатолійович	стандартні зразки, валідація, верифікація, метрологія – заступник директора Фармакопейного центру із наукової роботи, кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
Товмасян Єрануї Карапетівна	поточна координація робіт учений секретар Фармакопейного центру, кандидат біоло- гічних наук, старший науковий співробітник
Рудик Зухра Саламівна	економічне обґрунтування заступник директора Фармакопейного центру з економічних питань
Георгієвський Віктор Петрович	головний науковий співробітник-консультант член-кореспондент НАН України, доктор фармацевтичних наук, професор

**Оперативну координацію робіт зі створення Державної Фармакопеї здійснює відділ  
Державної Фармакопеї України Фармакопейного центру**

Гризодуб Олександр Іванович	завідувач відділу, доктор хімічних наук, професор
Товмасян Єрануї Карапетівна	керівник наукових напрямків «Загальні статті на лікарські форми та фармако-технологічні тести» і «Загальні статті та монографії на біологічні продукти», кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Терно Ірина Станіславівна	керівник наукового напрямку «Загальні статті на методи аналізу», кандидат хімічних наук
Леонт'єв Дмитро Анатолійович	керівник відділу «Валідація та стандартні зразки», кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
Георгієвський Геннадій Вікторович	керівник наукового напрямку «Екстемпоральні лікарські засоби», кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
Тихоненко Тетяна Михайлівна	керівник наукового напрямку «Монографії на лікарські субстанції»
Котов Андрій Георгійович	керівник наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина», провідний науковий співробітник, кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
Чікалова Світлана Олегівна	керівник наукових напрямків «Реактиви» та «Матеріали та контейнери»
Крупа Наталія Олександрівна	керівник наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»
Матвієнко Тетяна Микитівна	головний фахівець із наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»
Юдія Ірина Іванівна	головний фахівець із наукового напрямку «Монографії на готові лікарські засоби»
Котова Єліна Едуардівна	старший науковий співробітник із наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина», кандидат фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
Кишинець Неля Віталіївна	старший науковий співробітник із наукового напрямку «Загальні статті та монографії на біологічні продукти»

## **Відповідальні особи**

---

**Вовк Александра Григорівна**

старший науковий співробітник із наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина», кандидат біологічних наук, доцент

**Бикова Лідія Георгіївна**

старший науковий співробітник відділу із наукового напрямку «Лінгвістична підтримка створення Державної Фармакопеї України» (українська мова), кандидат філологічних наук, доцент

**Саматов Рустам Саламович**

розробка та підтримка комп'ютерної версії Державної Фармакопеї України, провідний інженер-програміст

### **Експериментальна підтримка:**

**Лабораторія фармакопейного аналізу Фармакопейного центру  
завідувач — Зінченко Олександр Анатолійович, кандидат фармацевтичних наук**



## IV. ОРГАНІЗАЦІЇ ТА УСТАНОВИ УКРАЇНИ, ЩО БРАЛИ УЧАСТЬ У РОЗРОБЦІ ДОПОВНЕННЯ 4 ДО ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ 1 ВИДАННЯ

«Артеріум», корпорація, Київ

Асоціація фармацевтичних виробників України, Київ

Ботанічний сад Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна

«Біолік», ПАТ, Харківське підприємство з виробництва імунобіологічних та лікарських препаратів

«БІОФАРМА», ПАТ, Київ

«Галичфарм», АТВТ, Львів

Державна служба України з лікарських засобів, Київ

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Харків

Державне підприємство «Центр імунобіологічних препаратів», Київ

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

Державне підприємство «Державний експертний центр МОЗ України», Київ

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів і кормових добавок, Львів

«ДіаПроф Мед», АТЗТ НВК, Київ

Дослідна станція лікарських рослин Української академії аграрних наук, Березоточа

Дослідний завод «ГНЦЛС», ТОВ, Харків

«ЕЙМ», ТОВ НВФК, Харків

Запорізький державний медичний університет

Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини, ННЦ, Харків

Інститут монокристалів НАН України, НТК, Харків

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

«ІнтерХім», ТДВ СП, Одеса

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика

«Ліктрави», ЗАТ, Житомир

«Лубнифарм», ВАТ, Лубни

Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького

Міністерство охорони здоров'я України, Київ

Науково-виробнича компанія «ФармБіотек», ТОВ, Київ

Науково-виробничий центр «Борщагівський ХФЗ», ЗАТ, Київ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Нікітський ботанічний сад — Національний науковий центр Української академії аграрних наук, Ялта

«Фармак», ВАТ, Київ

«Фарма Старт», ТОВ, Київ

Фармацевтична асоціація України, Київ

Фармацевтична компанія «Здоров'я», ТОВ, Харків



**Організації та установи України, що брали участь у розробці  
Доповнення 4 до Державної Фармакопеї України 1-го видання**

---

Фармацевтична фабрика КП «Луганська обласна «Фармація»»

Фармацевтична фірма «Дарниця», ЗАТ, Київ

Харківське фармацевтичне підприємство «Здоров'я народу», ТОВ

«ШимЮкрейн» Генеральний дистриб'ютер аналітичного обладнання Шимадзу в Україні, ТОВ, Київ

«Фітоком», ТОВ, Полтава

«АЛТ Україна Лтд», ТОВ, Київ

## V. ОРГАНІЗАЦІЇ ТА УСТАНОВИ, ЩО СПРИЯЛИ ВИДАННЮ ДОПОВНЕННЯ 4 ДО ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ 1 ВИДАННЯ

- «Фармак», ВАТ, Київ (голова правління - генеральний директор Жебровська Ф.І.)
- «Ліктрави», ЗАТ, Житомир, (голова правління Крисан Ф.В.)
- «БІОФАРМА», ПАТ, Київ (голова правління Маковський О.А.)
- «Фармацевтична фірма «Дарниця», (ЗАТ), Київ (голова правління - генеральний директор Загорій Г. В.)
- «Біолік», ПАТ, Харківське підприємство з виробництва імунобіологічних та лікарських препаратів, Харків (голова правління Карамавров В.С.)
- «ІнтерХім», ТДВ СП, Одеса (генеральний директор Редер А.С.)
- «Сперко Україна», ТОВ, спільне українсько-іспанське підприємство, Вінниця (директор Борисова Л.З.)
- «ЕЙМ», ТОВ НВФК, Харків (генеральний директор Чистяков О.Г.)
- «Кусум Фарм», ТОВ (генеральний директор Раджив Гупта)
- «Лекхім», ПАТ, Київ (голова правління Печаєв В.К.)



## VI. ВСТУП

Доповнення 4 (ДФУ 1.4) до Державної Фармакопеї України 1-го видання (ДФУ 1.0), підготоване Державним підприємством «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (Фармакопейний центр) на основі поточних видань (7.0 та Доповнення 7.1) Європейської Фармакопеї. Відповідно до Угоди між Фармакопейним центром і Фармакопеєю Сполучених Штатів Америки, при розробці загальних статей і монографій на готові лікарські засоби використовувалися також статті Фармакопеї США поточного видання (USP 33-NF 28, 2010), про що надається відповідне посилання. У роботі над ДФУ 1.4 ураховано досвід запровадження ДФУ 1.0 і попередніх Доповнень до Державної Фармакопеї України 1-го видання (ДФУ 1.1, ДФУ 1.2, ДФУ 1.3).

Загальні статті та монографії ДФУ 1.4, так само як ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2, ДФУ 1.3, побудовано у вигляді двох взаємопов'язаних частин – європейської частини, ідентичної відповідній статті Європейської Фармакопеї, і національної, що відбиває національну специфіку України.

Національна частина не суперечить європейській, а містить інформаційні матеріали, альтернативні методики, рекомендації та додаткові вимоги, що зараз вже є чинними в Україні.

Вимоги національної частини не є обов'язковими, якщо про це зазначено у тексті, вони також не є обов'язковими для субстанцій, що випускаються в умовах GMP, визнаних у Європейському Союзі, та мають сертифікат відповідності монографії Європейської Фармакопеї. Національні вимоги у цьому разі можуть використовуватися за бажанням, якщо вони більш жорсткі, ніж вимоги європейської частини, або доповнюють їх.

В ДФУ 1.4, так само як і в ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2 і ДФУ 1.3 максимально враховано стиль і будову Європейської Фармакопеї. Усі формули, літерні позначення, цифровий матеріал, одиниці виміру, нумерація розділів тощо подано в редакції Європейської Фармакопеї. Хімічні назви дані в редакції, максимально наближеній до європейської. Максимально наближені до Європейської Фармакопеї і назви монографій і реактивів. При цьому наводяться також відповідні вітчизняні синоніми. У вступній частині монографій на субстанції для фармацевтичного застосування у квадратних дужках як інформаційний матеріал звичайно наведено номер реєстрації в *Chemical Abstract Service (CAS)*.

У Доповненні 1.4 представлено такі типи статей:

- *нові статті*. Вони вводяться в дію разом із введенням у дію ДФУ 1.4.
- *переглянуті статті*. Вони вводяться в дію разом із введенням у дію ДФУ 1.4 замість відповідних статей ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2 і ДФУ 1.3. У Змісті такі статті позначені \*.

Текст переглянутих статей містить певні позначення:

- *трикутники* зазначають місце, де введена нова частина або текст був замінений або перероблений.
- *квадрат* зазначає місце, де частина тексту вилучена.

Ці позначення не є вичерпними, наведені лише для інформації та не є офіційною частиною тексту.

- *додатки до діючих статей*. Ці додатки доповнюють діючі тексти ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2 і ДФУ 1.3, не змінюючи їх. Самі вихідні тексти при цьому зберігаються. Додатки вводяться в дію разом із введенням у дію ДФУ 1.4, при цьому вони чинні лише разом з вихідними текстами, надрукованими у ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2 і ДФУ 1.3.

Усі тексти ДФУ 1.0, ДФУ 1.1, ДФУ 1.2 і ДФУ 1.3, надруковані у ДФУ 1.4, є чинними.

Перелік чинних текстів ДФУ надано у *Загальному Змісті Державної Фармакопеї України 1-го видання*.





## VII. ДОДАТКИ ДО ДІЮЧИХ ТЕКСТІВ ДФУ

### 2.2.N.2. ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК І ВИПРОБУВАНЬ

#### D. РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО КРИТЕРІЇВ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ВАЛІДАЦІЇ ДЛЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ

2.5. Рекомендації щодо проведення валідації методів об'ємного титрування. Методи об'ємного титрування в класичному розумінні не належать до методу стандарту, для якого наведені рекомендації у підрозділах 2.2.-2.4., однак «нормалізовані» координати та універсальні критерії прийнятності валідаційних характеристик, пов'язані з вимогами до максимально припустимої невизначеності аналізу ( $\Delta_{\text{в}}$ ), можуть бути використані і для методів об'ємного титрування. Головною відмінністю об'ємних методів титрування є суттєвий вплив систематичної похибки і одночасно дуже висока прецизійність. Тому може бути використана така концепція:

- систематична складова невизначеності має складати не більше як  $2/3$  від  $\Delta_{\text{в}}$ ;
- випадкова складова невизначеності має складати не більше як  $1/3$  від  $\Delta_{\text{в}}$ .

Валідаційні дослідження рекомендується проводити не менше як на 9 різних пробах, кількість титрованої речовини у яких рівномірно розподілена в досліджуваному діапазоні методики.

Нормалізовані координати  $X_i$ ,  $Y_i$  розраховують у такий спосіб:

$$X_i = \frac{m_i}{m_T} \cdot 100\%, \quad Y_i = \frac{V_i}{V_T} \cdot 100\%,$$

де:

- $m_i$  — наважка (кількість у пробі) речовини, що титрується;
- $V_i$  — об'єм титранту, витрачений на титрування;
- $m_T$  — номінальна наважка (кількість у пробі) речовини за методикою;
- $V_T$  — об'єм титранту, що відповідає номінальній наважці  $m_T$ .

У нормалізованих координатах розраховують лінійну залежність  $Y_i = a + bX_i$ .

Відношення «знайдено/введено», у відсотках ( $Z_i$ ), розраховують за формулою:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$$

Вимоги до деяких валідаційних характеристик залежать від кількості паралельних титрувань, що має виконуватись під час рутинного аналізу. При розрахунку таких валідаційних характеристик рекомендується: мінімальну кількість паралельних титрувань

під час рутинного аналізу ( $k$ ) при аналізі субстанцій приймати такою, що дорівнює 5, при аналізі готових лікарських засобів — 3.

#### 2.5.1. Вимоги до параметрів лінійної залежності

##### 2.5.1.1. Вимоги до вільного члена ( $a$ ) та кутового коефіцієнта ( $b$ )

*Критерій статистичної незначущості.* Вільний член  $a$  статистично незначуще відрізняється від нуля, якщо він не перевищує свій довірчий інтервал ( $\Delta_a$ ):

$$|a| \leq \Delta_a = \frac{t(95\%, n-2) \cdot s_a}{\sqrt{k}}$$

де:

- $s_a$  — стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої;
- $t$  — коефіцієнт Стьюдента для одностороннього розподілу, довірчої ймовірності 95 % і числа ступенів свободи  $\nu = n-2$ ;
- $n$  — обсяг вибірки (число точок прямої);
- $k$  — мінімальна кількість титрувань, що мають виконуватись під час рутинного аналізу.

Оцінюють статистичну незначущість величини  $|b-1|$  за формулою:

$$|b-1| \leq \Delta_b = \frac{t(95\%, n-2) \cdot s_b}{\sqrt{k}}$$

- $s_b$  — стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої.

*Критерій практичної прийнятності.* Якщо хоч один з критеріїв статистичної незначущості не виконується, використовують критерій практичної прийнятності, який регламентує систематичну похибку на межах діапазону (від 80 % до 120 %) методики ( $\delta_{80}$ ,  $\delta_{120}$ ):

$$\delta_{80} = 100 \cdot \left| \frac{a}{80} + (b-1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \Delta_{\text{в}} (\%),$$

$$\delta_{120} = 100 \cdot \left| \frac{a}{120} + (b-1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \Delta_{\text{в}} (\%),$$

де:

- $\Delta_{\text{в}} (\%)$  — максимально припустима невизначеність аналізу.

##### 2.5.1.2. Вимоги до залишкового стандартного відхилення ( $s_0$ ) та коефіцієнта кореляції.

$$s_0 \leq \frac{\sqrt{k} \cdot \Delta_{\text{в}} (\%)}{3 \cdot t(95\%, n-2)}$$



$$s_y (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}$$

$$r \geq \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_y^2}}$$

### 2.5.2. Правильність

Правильність оцінюють за двома критеріями.

*Критерій статистичної незначущості.*

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}}$$

де:

$Z$  — відношення «введено/знайдено»;

$\Delta_Z$  — довірчий інтервал, розрахований як зазначено у п. 2.3.3;

$n$  — обсяг вибірки (число точок прямої).

*Критерій практичної прийнятності.* Якщо наведене вище співвідношення не виконується, використовують критерій практичної прийнятності систематичної похибки:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{2 \cdot \Delta_{As}}{3}$$

### 2.5.2. Прецизійність

Однобічний довірчий інтервал середнього для мінімальної кількості титрувань, що має виконуватись під час рутинного аналізу ( $\Delta_{z,k}$ ), має задовольняти вимоги до випадкової складової невизначеності аналізу:

$$\Delta_{z,k} = \frac{s_z (\%) \cdot t(95\%, n-1)}{\sqrt{k}} \leq \frac{1}{3} \cdot \Delta_{As}$$

де:

$s_z$  — стандартне відхилення, виражене у відсотках, розраховане для відношень «знайдено/введено» для всіх розчинів, як зазначено у п. 2.3.3;

$k$  — мінімальна кількість титрувань, що мають виконуватись під час рутинного аналізу.

## 4. РЕАКТИВИ

### 4.1. РЕАКТИВИ, ЕТАЛОННІ РОЗЧИНИ, БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

#### 4.1.1. РЕАКТИВИ

**Агнузид.**  $C_{22}H_{26}O_{11}$ . (М.м. 466.4). 1162000. [11027-63-7]. (1RS, 4aSR, 5RS, 7aRS)-5-Гідрокси-7-[[4-гідроксибензоїл]окси]метил]-1,4a,5,7a-тетрагідроциклопента[с]піран-1-іл  $\beta$ -D-глюкопіранозид.

Кристали білого або майже білого кольору.

**Азіатикозид.**  $C_{48}H_{78}O_{19}$ . (М.м. 959). 1123500. [16830-15-2]. O-6-Деокси- $\alpha$ -L-манопіранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-глюкопіранозил-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-тригідрокси-4 $\alpha$ -урс-12-ен-28-оат.

Порошок білого або майже білого кольору. Гігроскопічний. Розчинний у метанолі, мало розчинний в етанолі, не розчинний в ацетонітрилі.

Температура плавлення: близько 232 °С, із розкладанням.

Вода (2.5.12). 6.0 %.

*Азіатикозид, використовуваний для рідинної хроматографії, має витримувати таке додаткове випробування.*

*Кількісне визначення.* Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у статті *Центела*.

*Вміст:* не менше 97.0 %. Для розрахунку використовують метод внутрішньої нормалізації.

*Зберігання:* у захищеному від вологи місці.

**Аукубін.**  $C_{15}H_{22}O_9$ . (М.м. 346.3). 1145200. [479-98-1]. [1S, 4aR, 5S, 7aS)-5-Гідрокси-7-(гідроксиметил)-1,4a,5,7a-тетрагідроциклопента[с]піран-1-іл  $\beta$ -D-глюкопіранозид.

Кристали. Розчинний у воді, 96 % спирті та метанолі, практично не розчинний у пертолейному ефірі.

$[\alpha]_D^{20}$ : близько -163.

Температура плавлення: близько 181 °С.

**Гесперидин.**  $C_{28}H_{34}O_{15}$ . (М.м. 611). 1139000. [520-26-3]. (S)-7-[[6-O-(6-Деокси- $\alpha$ -L-манопіранозил)- $\beta$ -D-глюкопіранозил]окси]-5-гідрокси-2-(3-гідрокси-4-метоксифеніл)-2,3-дигідро-4H-1-бензопіран-4-он.

Гігроскопічний порошок. Мало розчинний у воді та метанолі.

Температура плавлення: від 258 °С до 262 °С.

Дейтерований натрію триметилсилілпропіонат.  $C_9H_9^2H_2NaO_2Si$ . (М.м. 172.3). 1179100. [24493-21-8]. Натрію 3-(триметилсиліл)(2,2,3,3- $^2H_4$ )пропіонат. TSP-d<sub>4</sub>.

Ступінь дейтерування: не менше 98 %.

Порошок білого або майже білого кольору.

Дигідрокапсаїцин.  $C_{18}H_{29}NO_3$ . (М.м. 307.4). 1148100. [19408-84-5]. *N*-[(4-Гідрокси-3-метоксифеніл)метил]-8-метилнонанамід.

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Практично не розчинний у холодній воді, легко розчинний в етанолі.

Діамонію 2,2'-азинобіс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонат).  $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ . (М.м. 548.7). 1153000. [30931-67-0]. ABTS. Діамонію 2,2'-(діазанділіден)біс[3-етил-2,3-дигідробензотіазол-6-сульфонат].

Хромогенний субстрат придатний для використання у процедурах ELISA.

Таблетки зеленого кольору. Легко розчинний у воді. рН (2.2.3). Від 4.2 до 5.8. Вимірюють рН розчину 0.1 г/л.

ДСН-ПАГ буферний робочий розчин. 1114900.

151.4 трис(гідроксиметил)амінометану Р, 721.0 г гліцину Р і 50.0 г натрію лаурилсульфату Р розчиняють у воді Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 5000 мл. Безпосередньо перед використанням розводять водою Р у 10 разів і перемішують. рН (2.2.3) одержаного розчину має бути від 8.1 до 8.8.

ДСН-ПАГ буферний розчин для зразків концентрований. 1115000.

1.89 г трис(гідроксиметил)амінометану Р, 5.0 г натрію лаурилсульфату Р і 50 мг бромфенолового синього Р розчиняють у воді Р, додають 25.0 мл гліцерину Р і доводять водою Р до об'єму 100 мл. Доводять рН розчину до 6.8 кислотою хлористоводневою Р і доводять об'єм водою Р до 125 мл.

ДСН-ПАГ буферний розчин для зразків концентрований (відновлювальні умови). 1122100.

3.78 г трис(гідроксиметил)амінометану Р, 10.0 г натрію додецилсульфату Р і 100 мг бромфенолового синього Р розчиняють у воді Р, додають 50.0 мл гліцерину Р і доводять водою Р до об'єму 200 мл. До одержаного розчину додають 25.0 мл 2-меркаптоетанолу Р, доводять рН розчину до 6.8 кислотою хлористоводневою Р і доводять об'єм водою Р до 250.0 мл.

Альтернативно як відновлююча речовина замість 2-меркаптоетанолу може бути використаний дитіотреїтол. У цьому разі даний буферний розчин готують таким чином: 3.78 г трис(гідроксиметил)

амінометану Р, 10.0 г натрію додецилсульфату Р і 100 мг бромфенолового синього Р розчиняють у воді Р, додають 50.0 мл гліцерину Р і доводять водою Р до об'єму 200 мл. Доводять рН розчину до 6.8 кислотою хлористоводневою Р і доводять об'єм водою Р до 250.0 мл. Безпосередньо перед використанням додають дитіотреїтол Р до кінцевої концентрації 100 мМ.

Ендопротеаза LysC. 1173200.

Мікробіологічний позаклітинний протеолітичний фермент продукований *Achromobacter lyticus*.

Ліофілізований порошок, вільний від солей.

Знебарвлюючий розчин. 1012202.

Суміш кислота оцтова льодяна Р - метанол Р - вода Р (1:4:5).

Капсаїцин.  $C_{18}H_{27}NO_3$ . (М.м. 305.4). 1147900. [404-86-4]. (Е)-*N*-[(4-Гідрокси-3-метоксифеніл)метил]-8-метилнон-6-енамід.

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Практично не розчинний у воді, легко розчинний в етанолі.

Температура плавлення: близько 65 °С.

Капсаїцин, використовуваний для кількісного визначення у статті Стручковий перець, має витримувати таке додаткове випробування.

Кількісне визначення. Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у статті Стручковий перець.

Вміст: не менше 95.0 %. Для розрахунку використовують метод внутрішньої нормалізації.

О-Кумарова кислота.  $C_9H_8O_3$ . (М.м. 164.2). 1157400. [614-60-8]. (Е)-2-Гідроксикорична кислота. (2Е)-3-(2-Гідроксифеніл)проп-2-енова кислота.

Порошок білого або майже білого кольору.

Температура плавлення: близько 217 °С.

Кумасі забарвлювальний розчин Р1. 1173000.

0.275 г брильянтового синього Р перемішують із 200 мл метанолу Р до повного розчинення кристалів (близько 2 год), додають 750 мл води Р і 50 мл кислоти оцтової льодяної Р. Перемішують протягом ночі (не менше 16 год), фільтрують.

Нарингін.  $C_{27}H_{32}O_{14}$ . (М.м. 580.5). 1137300. [10236-47-2]. 7-[[2-О-(6-Деокси-α-L-манопіранозил)-β-D-глюкопіранозил]окси]-5-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-2,3-дигідро-4H-хромен-4-он.

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Мало розчинний у воді, розчинний у метанолі та диметилформаміді.

Температура плавлення: близько 171 °С.

## Додатки до діючих текстів ДФУ

*Оптична густина* (2.2.25). Нарингін розчиняють у розчині 5 г/л диметилформаміду Р у метанолі Р. Одержаний розчин повинен мати максимум за довжини хвилі 283 нм.

**Пентафторпропіоновий ангідрид.**  $C_6F_{10}O_3$ . (М.м. 310.0). 1177300. [356-42-3].

Пентафторпропановий ангідрид.

**Піридинію гідробромід пербромід.**  $C_5H_6Br_3N$ . (М.м. 319.8). 1166100. [39416-48-3]. Піридинію трибромід(1-).

Кристали червоного кольору.

**Силібінін.**  $C_{25}H_{22}O_{10}$ . (М.м. 482.4). 1151400. [22888-70-6]. Силібін. (2R,3R)-3,5,7-Тригідрокси-2-[(2R,3R)-3-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-2-(гідроксиметил)-2,3-дигідро-1,4-бензодіоксин-6-іл]-2,3-дигідро-4H-1-бензопіран-4-он.

Порошок білого або жовтавого кольору. Практично не розчинний у воді, розчинний в ацетоні та метанолі.

*Силібінін, використовуваний для кількісного визначення у статті Розторопші плоди, має витримувати таке додаткове випробування.*

*Кількісне визначення.* Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у статті Розторопші плоди.

*Випробовуваний розчин.* 5.0 мг силібініну, висушеного у вакуумі, розчиняють у метанолі Р та доводять об'єм тим самим розчинником до 50.0 мл.

*Вміст силібініну А та силібініну В:* не менше 95.0 %. Для розрахунку використовують метод внутрішньої нормалізації.

**Таксифолін.**  $C_{15}H_{12}O_7$ . (М.м. 304.3). 1151800. [480-18-2]. (2R,3R)-2-(3,4-Дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-2,3-дигідро-4H-1-бензопіран-4-он.

Порошок білого або майже білого кольору. Мало розчинний в етанолі.

*Оптична густина* (2.2.25). Розчин в етанолі Р повинен мати максимум за довжини хвилі 290 нм.

**Тетраметилбензидин.**  $C_{16}H_{20}N_2$ . (М.м. 240.3). 1132600. [54827-17-7]. 3,3',5,5'-Тетраметилбіфеніл-4,4'-діамін.

Порошок. Практично не розчинний у воді, легко розчинний в метанолі.

Температура плавлення: Близько 169 °С.

**Ферулова кислота.**  $C_{10}H_{10}O_4$ . (М.м. 194.2). 1149500. [1135-24-6]. 4-Гідрокси-3-метоксикорична кислота. 3-(4-Гідрокси-3-метоксифеніл)пропенова кислота.

Порошок блідо жовтого кольору. Легко розчинний у метанолі.

Температура плавлення: від 172.9 °С до 173.9 °С.

*Ферулова кислота, використовувана для кількісного визначення елеутерозиду в статті Елеутерокок, має витримувати таке додаткове випробування.*

*Кількісне визначення.* Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у статті Елеутерокок.

*Вміст:* не менше 99 %. Для розрахунку використовують метод внутрішньої нормалізації.

**Фіксуєуючий розчин для ізоелектрофокусування в поліакриламідному гелі.** 1138700.

Розчин, що містить 35 г кислоти сульфосаліцилової Р та 100 г кислоти трихлороцтової Р у 1 л води Р.

**Цитронелаль.**  $C_{10}H_{18}O$ . (М.м. 154.3). 1113300. [106-23-0]. 3,7-Диметил-6-октеналь.

Дуже мало розчинний у воді, розчинний у 96 % спирті.

$d_{20}^{20}$ : від 0.848 до 0.856.

$n_D^{20}$ : близько 1.446.

*Цитронелаль, використовуваний для газової хроматографії, має витримувати таке додаткове випробування.*

*Кількісне визначення.* Газова хроматографія (2.2.28), як зазначено у статті Цитронелова олія.

*Вміст:* не менше 95.0 %. Для розрахунку використовують метод внутрішньої нормалізації.

### 4.1.3. БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

**Фосфатний забуферений сольовий розчин рН 7.4.** 4005000.

2.38 г динатрію гідрофосфату Р, 0.19 г калію дигідрофосфату Р та 8.0 г натрію хлориду Р розчиняють у воді Р й доводять об'єм тим самим розчинником до 1000.0 мл. У разі необхідності регулюють рН.

**0.05 М Трис-гідрохлориду буферний розчин рН 9.0.** 4013500.

0.605 г трис(гідроксиметил)амінометану Р розчиняють у воді Р, доводять рН 1 М розчином кислоти хлористоводневої та доводять об'єм водою Р до 100.0 мл.

N

#### 4.1.1. РЕАКТИВИ<sup>N</sup>

**8-Амінонафтален-2-сульфонова кислота<sup>N</sup>.**  $C_{10}H_9NO_3S$ . (М.м. 223.2). [119-28-8]. 8-Аміно-2-нафталенсульфонова кислота. 1-Нафтіламін-7-сульфонова кислота.

**Амінонафталенсульфонової кислоти розчин<sup>N</sup>.**

Змішують 0.5 г *δ*-амінонафтален-2-сульфонової кислоти *P*<sup>N</sup>, 30 мл кислоти оцтової льодяної *P*, 120 мл води *P* та нагрівають при перемішуванні до розчинення; охолоджують і фільтрують.

Термін придатності 3 тижні.

**Динітрофенілгідазину метанольний розчин<sup>N</sup>.**

1.00 г динітрофенілгідазину *P*, попередньо висушеного протягом 8 год за тиску близько 2,7 кРа, розчиняють у 2 мл кислоти сірчаної *P* та доводять об'єм розчину метанолом *P* до 100 мл.

**Калію гідроксиду метанольний розчин<sup>N</sup>.**

10.0 г калію гідроксиду *P* розчиняють у 50 мл води *P* та доводять об'єм метанолом *P* до 100 мл.

**Сульфанілової кислоти розчин<sup>N</sup>.**

Змішують 0.5 г сульфанілової кислоти *P*, 30 мл кислоти оцтової льодяної *P*, 120 мл води *P* та нагрівають при перемішуванні до розчинення; охолоджують і фільтрують.

Термін придатності 3 тижні.

**4.1.2. ЕТАЛОННІ РОЗЧИНИ ДЛЯ ВИПРОБУВАНЬ НА ГРАНИЧНИЙ ВМІСТ ДОМІШОК<sup>N</sup>****Нітриту еталонний розчин (20 ppm NO<sub>2</sub>)<sup>N</sup>.**

0.6 г натрію нітриту *P*, у перерахунку на NaNO<sub>2</sub>, розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою *P* до 200.0 мл. Розчини готують безпосередньо перед використанням.

**4.2.2. ТИТРОВАНІ РОЗЧИНИ<sup>N</sup>****0.0167 М розчин калію йодату<sup>N</sup>.**

3.57 г калію йодату *P* розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл.

*Встановлення титру.* До 20.0 мл приготованого розчину калію йодату додають 2 г калію йодиду *P*, 25 мл кислоти сірчаної розведеної *P* і титрують 0.1 М розчином натрію тіосульфату, використовуючи як індикатор 1 мл розчину крохмалю *P*, який додають наприкінці титрування.

**0.05 М розчин натрію едетату<sup>N</sup>.**

18.8 г натрію едетату *P* розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл.

*Встановлення титру.* 3.0 г цинку *PO* розчиняють у 60 мл кислоти сірчаної розведеної *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 1000.0 мл. До 25.0 мл приготованого розчину додають 5 мл аміачного буферного розчину рН 10.0 *P*, 0.1 г індикаторної суміші протравного чорного 11 *P*, 70 мл води *P*, перемішують до розчинення індикатору і титрують приготованим розчином натрію едетату до переходу фіолетового забарвлення в яскраво-синє (без фіолетового відтінку).

1 мл 0.05 М розчину натрію едетату<sup>N</sup> відповідає 3.269 мг Zn.



# ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ



## 2. МЕТОДИ АНАЛІЗУ

### 2.1. ОБЛАДНАННЯ

#### 2.1.3. УЛЬТРАФІОЛЕТОВІ ЛАМПИ ДЛЯ АНАЛІТИЧНИХ ЦІЛЕЙ

У кварцових лампах як джерело ультрафіолетового світла використовують пари ртуті. Для усунення видимої частини спектра випромінювання лампи може бути встановлений підходящий фільтр. Якщо у Фармакопеї зазначено проведення випробування з використанням ультрафіолетового світла за довжини хвилі 254 нм або 365 нм, використовують обладнання, що включає ртутно-парові лампи і фільтр, який дає смугу випускання спектра з максимальною інтенсивністю близько 254 нм або 365 нм. Використовувані лампи поза сумнівом дозволяють виявити стандартну пляму натрію саліцилату з діаметром близько 5 мм на підкладці *силікагелю G P* при розташуванні випробовуваної плями перпендикулярно відносно випромінювання.

З цією метою беруть 5 мкл розчину 0.4 г/л *натрію саліцилату Р* у *спирті Р<sup>(1)</sup>* для ламп з випромінюванням за 254 нм і 5 мкл розчину 2 г/л у *спирті Р<sup>1</sup>* для ламп з максимальним випромінюванням за 365 нм. Відстань між лампою і хроматографічною пластинкою, використовуюваною у випробуванні, зазначеному у Фармакопеї, не має перевищувати відстані, використовуюваної при проведенні вищезазначеного тесту.

#### 2.1.6. ІНДИКАТОРНІ ТРУБКИ

Індикаторні трубки для визначення газів є циліндричними герметичними трубками, виготовленими з інертного прозорого матеріалу, конструкція яких дозволяє пропускати через них газ. Трубки містять реактиви, адсорбовані на інертних носіях, що дозволяють візуалізувати визначувані речовини; і, якщо необхідно, трубки також можуть мати попередні шари і/або адсорбційні фільтри для видалення речовин, що заважають визначенню аналізованої речовини. Індикаторний шар містить або один реактив, призначений для визначення конкретної домішки, або декілька реактивів для визначення декількох речовин (моношарові та багатошарові трубки).

Випробування проводять шляхом пропускання необхідного об'єму випробовуваного газу через індикаторну трубку. Довжина забарвленого шару або ступінь зміни забарвлення за градувальною шкалою дають інформацію про наявні домішки.

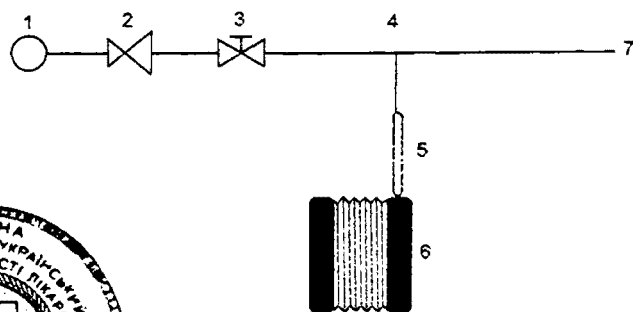
Калібрування індикаторних трубок проводять відповідно до інструкції виробника.

*Умови проведення випробування.* Випробування проводять відповідно до інструкції виробника або як зазначено нижче.

Пристрій для подавання газу приєднують до підходячого регулятора тиску і голчатого клапана. Гнучкий шланг, споряджений трійником, приєднують до клапана, регулюють потік випробовуваного газу, продуваючи ним шланг для одержання необхідного потоку (див. Рис. 2.1.6.-1). Готують індикаторну трубку та приєднують її до дозуючого насоса відповідно до інструкції виробника. Відкритий кінець індикаторної трубки приєднують до короткого відведення шланга і пропускають через трубку необхідний об'єм випробовуваного газу, виконавши необхідне число тактів роботи насоса. Відзначають значення, що відповідає довжині забарвленого шару або інтенсивності забарвлення за градувальною шкалою. При одержанні негативного результату проводять верифікацію індикаторних трубок, використовуючи калібрувальний газ, що містить відповідну домішку. Враховуючи велике різноманіття використовуваних компресорних масел, необхідно перевіряти реакцію індикаторних трубок для масел, на компресорне масло, що використовується. Інформація про реакційну здатність різних масел зазначається у супровідному листку, що додається до трубки. Якщо використовуване масло не зазначене у супровідному листку, виробник трубки повинен перевірити реакційну здатність масла і, якщо необхідно, забезпечити користувача спеціальною трубкою для даного масла.

**Індикаторна трубка для вуглецю діоксиду.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підходи носії для індикаторів: гідразину і кристалічного фіолетового. Мінімальна визначувана концентрація — 100 ppm з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 15\%$ .

**Індикаторна трубка для сірки діоксиду.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підходи носії для йоду та індикатора — крохмалю.



1 - пристрій для подавання газу; 2 - регулятор тиску; 3 - голчатий клапан; 4 - трійник; 5 - індикаторна трубка; 6 - дозуючий насос для індикаторної трубки; 7 - відкритий кінець шланга.

Рисунок 2.1.6.-1. Прилад для газових індикаторних трубок

(1) У використовуюваному *спирті Р* не має виявлятися флуоресценція.



## 2.1 Обладнання

Мінімальна визначувана концентрація — 0.5 ррт з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 15\%$ .

**Індикаторна трубка для масла.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підхожі носії для індикатора — сірчаної кислоти. Мінімальна визначувана концентрація — 0.1 мг/м<sup>3</sup> з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 30\%$ .

**Індикаторна трубка для азоту оксиду і азоту діоксиду.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підхожі носії для окиснюючого шару — солі Cr(VI) й індикатора — дифенілбензидину. Мінімальна визначувана концентрація — 0.5 ррт із відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 15\%$ .

**Індикаторна трубка для вуглецю оксиду.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та

підхожі носії для індикаторів: йоду(V) оксиду, селену діоксиду і сірчаної кислоти димлячої. Мінімальна визначувана концентрація — 5 ррт або менше з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 15\%$ .

**Індикаторна трубка для сірководню.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підхожі носії для індикатора — солі свинцю. Мінімальна визначувана концентрація — 1 ррт або менше з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 10\%$ .

**Індикаторна трубка для пари води.** Герметична скляна трубка, що містить адсорбційні фільтри та підхожі носії для індикатора — магнію перхлорату. Мінімальна визначувана концентрація — 67 ррт або менше з відносним стандартним відхиленням — не більше  $\pm 20\%$ .

## 2.2. ФІЗИЧНІ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ

### 2.2.1. ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЗОРОСТІ І СТУПЕНЯ КАЛАМУТНОСТІ РІДИН

#### ▼ ВИЗУАЛЬНИЙ МЕТОД

Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробовуваної рідини порівнюють з 40-мм шаром свіжоприготованого, як зазначено нижче, еталона. Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки уздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від *води Р*, а еталон II легко відрізнявся від еталона I.

Випробовувану рідину вважають *прозорою*, якщо вона витримує порівняння з *водою Р* або розчином, використовуваним при приготуванні випробовуваної рідини при перегляді за зазначених вище умов, або її каламутність не перевищує каламутності еталона I.

**Розчин гідразину сульфату.** 1.0 г *гідразину сульфату Р* розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 100.0 мл. Розчин витримують протягом 4–6 год.

**Розчин гексаметилентетраміну.** 2.5 г *гексаметилентетраміну Р* розчиняють у 25.0 мл *води Р* у колбі місткістю 100 мл зі скляною притертою пробкою.

**Вихідна суспензія (суспензія формазину).** 25.0 мл розчину гідразину сульфату додають до приготованого розчину гексаметилентетраміну, перемішують і залишають на 24 год. Суспензія стабільна протягом 2 міс при зберіганні в скляному посуді, що не має дефектів поверхні. Суспензія не має прилипати до скла, і її необхідно ретельно збовтувати перед використанням.

**Основна суспензія.** 15.0 мл вихідної суспензії поміщають у колбу місткістю 1000.0 мл і доводять *водою Р* до позначки. Термін придатності основної суспензії 24 год.

**Еталони.** Приготування еталонів проводять відповідно до Табл. 2.2.1-1.

Основну суспензію і *воду Р* перемішують і струшують безпосередньо перед використанням.

Таблиця 2.2.1.-1

	Еталон			
	I	II	III	IV
Основна суспензія	5.0 мл	10.0 мл	30.0 мл	50.0 мл
<i>Вода Р</i>	95.0 мл	90.0 мл	70.0 мл	50.0 мл

**Стандарт каламутності.** Суспензію формазину, приготовану змішуванням рівних об'ємів розчину гідразину сульфату і розчину гексаметилентетраміну, беруть за первинний стандарт із значенням каламутності 4000 NTU (нефелометричних одиниць каламутності). Еталони I, II, III і IV мають значення 3 NTU, 6 NTU, 18 NTU і 30 NTU, відповідно. Для приготування розведених стабільних еталонів каламутності можуть бути використані промислові стабілізовані суспензії формазину після порівняння з приготованим, як зазначено, первинним стандартом каламутності.

Формазин володіє рядом необхідних якостей, які дозволяють йому бути ідеальним стандартом каламутності. Стандарт формазину може бути приготований з проконтрольованих вихідних речовин з достатньою відтворюваністю. Фізичні характеристики роблять його оптимальним калібрувальним стандартом для визначення розсіяння світла. Формазин, що є полімером, складається з ланцюгів різної довжини, які скручені в структури довільної конфігурації. Це дає можливість широкодіапазонного визначення частинок різних форм і розмірів, які аналітично відповідають можливим розмірам і формам частинок, що знаходяться в реальних зразках. Завдяки властивостям розсіяння стандарту формазину, відтворюваності і простежуваності на даному стандарті в основному базуються алгоритми калібрування приладу і критерії ефективності функціонування аналітичної системи.

#### ІНСТРУМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ

##### ВСТУП

Ступінь каламутності також може бути визначений за оптичною густиною опалесціючих розчинів і суспензій вимірюванням на приладі поглиненого або розсіяного випромінювання. Існують 2 таких методи – нефелометрія і турбідиметрія. Для турбідиметричних вимірювань забарвлених зразків використовують прилади з функцією відносного вимірювання світлового потоку, в яких об'єднані принципи турбідиметрії і нефелометрії.

Ефект розсіяння світла суспендованими частинками може бути виміряний реєстрацією як випромінювання, яке пройшло (турбідиметрія), так і розсіяного випромінювання (нефелометрія). Турбідиметрія, яка базується на співвідношенні сигналів, комбінує принципи як нефелометрії, так і турбідиметрії. Турбідиметрія і нефелометрія застосовні для вимірювання слабо опалесціючих суспензій. Використовувані еталони мають бути приготовані в чітко визначених умовах. Для кількісних вимірювань необхідна побудова калібрувальних кривих, оскільки залежність між оптичними властивостями суспензій і концентрацією диспергованої фази в кращому разі є напівемпіричною.

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

Визначення каламутності забарвлених рідин проводять з використанням приладів з функцією відносного вимірювання світлового потоку, оскільки забарвлення обумовлює негативну інтерференцію, результатом якої є ослаблення як падаючого, так і розсіяного світла, і зниження значення каламутності. Ефект є таким сильним, що звичайні нефелометри не можуть бути використані навіть для помірно забарвлених зразків.

Інструментальне визначення прозорості і каламутності забезпечує об'єктивніше проведення випробування, результати якого не залежать від гостроти зору аналітика. Числові результати є придатнішими для контролю якості і контролю технологічного процесу, особливо на стадії вивчення стабільності. Наприклад, попередні числові дані зі стабільності можуть бути використані для прогнозування терміну придатності при зберіганні як даної серії дозованої лікарської форми, так і діючої субстанції.

### НЕФЕЛОМЕТРИЯ

Якщо суспензію переглядати під прямим кутом до напрямку падаючого світла, спостерігається розсіяння, зумовлене віддзеркаленням світла від частинок суспензії (ефект Тіндаля). Певна частина падаючого світлового променя пропускається, інша частина поглинається, а частина, що залишилася, розсіюється зваженими частинками каламутної рідини. При проведенні вимірювань під кутом 90 °С до світлового променя світлорозсіяння, викликане зваженими частинками, може бути використане для визначення концентрації частинок, за умови, що число і розмір цих частинок залишаються постійними. Ступінь каламутності еталона має залишатися постійним, і випробовуваний зразок, і еталон мають бути приготовані в однакових умовах. Ефект Тіндаля залежить як від кількості частинок, так і їх розмірів. Нефелометричні вимірювання достовірніші в діапазоні низьких значень каламутності, в якому виконується лінійна залежність між значеннями нефелометричних одиниць каламутності (NTU) і відносними сигналами детектора. При збільшенні ступеня каламутності падаюче світло впливає не на всі частинки, до того ж попадання розсіяного випромінювання від інших частинок на детектор ускладнюється. Таким чином, вимірювання є достовірними в діапазоні нефелометричних значень не більше як від 1750 NTU до 2000 NTU. Для підтвердження лінійної залежності будують калібрувальну криву не менше як за 4 значеннями концентрації.

### ТУРБІДИМЕТРИЯ

Каламутність є оптичною властивістю рідини, яка є проявом взаємодії між світлом і зваженими в рідині частинками. Каламутність викликає розсіяння і поглинання світла більшою мірою, ніж пропускання світла крізь зразок. Кількість твердої речовини в суспензії може бути визначена вимірюванням пройде-

ного світла. Лінійну залежність між каламутністю і концентрацією можна отримати, якщо суспензія гомогенна і містить частинки одного розміру. Це можливо в дуже розведених суспензіях, що містять маленькі частинки. Для підтвердження лінійної залежності між ступенем каламутності і концентрацією будують калібрувальну криву не менше як за 4 значеннями концентрації.

### ТУРБІДИМЕТРИЯ, ЯКА БАЗУЄТЬСЯ НА СПІВВІДНОШЕННІ СИГНАЛІВ

У турбідиметрії, яка базується на співвідношенні сигналів (ratio-турбідиметрії), вимірюється відношення пройденого світла до розсіяного під кутом 90 °С. Такий захід компенсує зниження інтенсивності випромінювання, що відбувається внаслідок забарвлення зразка. Вплив забарвлення зразка може також бути усунений шляхом використання в приладі як джерела світла інфрачервоного світло-випромінюючого діода (ІЧ СД) з довжиною хвилі 860 нм. Фотодіодні детектори приладу отримують і вимірюють розсіяне світло під кутом 90° відносно зразка, а також суму розсіяного в прямому напрямку світла і світла, що пройшло крізь зразок. Результати вимірювання, виражені в NTU, отримують шляхом розрахунку відношення значення розсіяного світла, виміряного під кутом 90°, до суми значень прямого розсіяння і світла, що пройшло. У турбідиметрії, яка базується на співвідношенні сигналів, вплив стороннього світлорозсіяння стає незначущим. Для вимірювання ступеня каламутності незабарвлених рідин використовуються нефелометри.

Вимірювання каламутності еталонів I-IV на турбідиметрі з функцією відносного вимірювання світлового потоку (Ratio™) показує лінійну залежність між концентраціями і вимірними значеннями NTU (див. Табл. 2.2.1.-2). Еталони I-IV (ДФУ) можуть бути використані для калібрування приладу.

Таблиця 2.2.1.-2

Суспензії формазину	Значення каламутності (NTU)
Еталон I	3
Еталон II	6
Еталон III	18
Еталон IV	30
Основна суспензія	60
Вихідна суспензія	4000

### ІНСТРУМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ КАЛАМУТНОСТІ

Вимоги окремих статей засновані на візуальному методі з використанням зазначених еталонів. Для визначення відповідності вимогам окремої статті також можуть бути використані інструментальні методи, за умови, що технічні характеристики приладу відповідають критеріям прийнятності, зазначеним нижче. Калібрування приладу проводять з вико-

ристанням еталонів I-IV і води Р або зазначеного розчинника.

*Приклад.* У приладах з функцією відносного вимірювання світлового потоку використовується як джерело світла вольфрамова лампа розжарювання із спектральною чутливістю близько 550 нм з колірною температурою волоска розжарення 2700 К або інфрачервоний світловипромінюючий діод (ІЧ СД) з довжиною хвилі 860 нм та шириною спектральної смуги 60 нм. Допускається використання інших підхожих джерел світла. Для реєстрації змін в розсіюванні та пропусканні світла зразком звичайно використовуються кремнієві фотодіоди і фотоелектронні помножувачі. Світло, розсіяне під кутом ( $90^\circ \pm 2.5$ ), реєструється первинним вимірювальним перетворювачем. Інші детектори реєструють зворотне і пряме розсіяння, а також випромінювання, що пройшло. Використовують прилади, відкалібровані за еталонами з відомою каламутністю, за допомогою яких можна реєструвати каламутність у автоматичному режимі. Реєстровані приладом результати вимірювань, виражені в одиницях NTU, порівнюють із специфікованими значеннями, зазначеними в окремій статті.

Прилади мають відповідати таким технічним характеристикам:

- *Одиниці вимірювання:* NTU. NTU базуються на значенні каламутності первинного стандартного зразка формазину. Також використовуються FTU (турбідиметричні одиниці за формазинном) або FNU (нефелометричні одиниці за формазинном), які еквівалентні NTU в діапазонах низьких значень (до 40 NTU). Ці одиниці використовуються в 3 інструментальних методах (нефелометрії, турбідиметрії та турбідиметрії, яка базується на співвідношенні сигналів).
- *Діапазон вимірювання:* від 0.01 NTU до 1100 NTU.
- *Розрізнення:* 0.01 NTU — для діапазоні від 0 NTU до 10 NTU, 0.1 NTU — в діапазоні від 10 NTU до 100 NTU, і 1 NTU — для діапазону > 100 NTU. Прилад калібрують і контролюють за еталонами формазину.
- *Правильність:* Від 0 NTU до 10 NTU:  $\pm(2\%$  поділки шкали + 0.01) NTU. Від 10 NTU до 1000 NTU:  $\pm 5\%$ .
- *Відтворюваність:* Від 0 NTU до 10 NTU:  $\pm 0.01$  NTU. Від 10 NTU до 1000 NTU:  $\pm 2\%$  виміряного значення.
- *Калібрування:* за 4 еталонами формазину в необхідному діапазоні. Еталони, зазначені в даній загальній статті, або відповідні стандартні зразки, відкалібровані за первинною стандартною суспензією формазину.
- *Стороннє світлорозсіяння:* є джерелом значущих помилок в діапазоні низьких значень каламутності; потрапляє на детектор оптичної системи приладу, але при цьому не виходить від зразка: < 0.15 NTU — для діапазону від 0 NTU до 10 NTU, < 0.5 NTU — для діапазону від 10 NTU до 1000 NTU.

Для визначення відповідності вимогам окремої статті замість візуального методу можуть бути використані прилади, відповідні зазначеним вище критеріям, і верифіковані з використанням еталонів, зазначених у розділі «Візуальний метод».

Прилади з діапазоном або розрізненням, правильною і відтворюваністю, що відрізняються від зазначених, можуть бути використані за умови їх повної кваліфікації для передбачуваного використання. Також має бути валідована методика випробування для конкретних субстанцій/препаратів для підтвердження придатності її використання для аналізу. При виборі приладу і методики мають враховуватися властивості випробовуваного зразка. ▲

### 2.2.20. ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНЕ ТИТРУВАННЯ

При потенціометричному титруванні кінцеву точку титрування визначають, вимірюючи електрорушійну силу (е.р.с.) електродної пари, що складається з індикаторного електрода і електрода порівняння або 2 індикаторних електродів, занурених у випробовуваний розчин як функцію кількості доданого титранту.

Е.р.с. звичайно вимірюють при нульовому або практично нульовому струмі.

*Приклад.* Використовуваний прилад (простий потенціометр або електронний пристрій) включає вольтметр з розрізненням близько мілівольта.

Вибір індикаторного електрода залежить від природи визначуваної речовини. Цей електрод може бути скляним або металевим (наприклад, платиновим, золотим, срібним або ртутним). Електродом порівняння звичайно є каломельний або хлорсрібний електрод.

Для кислотно-основного титрування, якщо немає інших зазначень в окремій статті, використовують систему скляного і каломельного або скляного і хлорсрібного електродів.

*Методика.* Якщо необхідно, нейтралізують розчинник перед розчиненням випробовуваної субстанції. Будують криву залежності зміни е.р.с. від кількості доданого титранту, продовжуючи додавати титрант понад передбачувану точку еквівалентності. Кінцева точка відповідає різкій зміні е.р.с.

### 2.2.32. ВТРАТА В МАСІ ПРИ ВИСУШУВАННІ

Визначення втрати в масі при висушуванні проводять одним з наведених способів і виражають у відсотках (м/м).

*Методика.* Зазначену в окремій статті кількість випробовуваної речовини поміщають у зважений бюкс, попередньо висушений за умов, описаних

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

для випробовуваної речовини. Речовину сушать до постійної маси або протягом часу, зазначеного в окремій статті, одним з наведених нижче способів. Якщо для температури висушування зазначено не температурний інтервал, а одинарне значення температури, висушування проводять при зазначеній температурі  $\pm 2$  °С.

- a) «в ексикаторі»: висушування проводять над фосфору(V) оксидом Р за атмосферного тиску і кімнатної температури;
- b) «у вакуумі»: висушування проводять над фосфору(V) оксидом Р за тиску від 1.5 кПа до 2.5 кПа і кімнатної температури;
- c) «у вакуумі в межах зазначеного температурного інтервалу»: висушування над фосфору(V) оксидом Р за тиску від 1.5 кПа до 2.5 кПа і температури, зазначеної в окремій статті;
- d) «в межах зазначеного температурного інтервалу»: висушування у сушильній шафі за температурного інтервалу, зазначеного в окремій статті;
- e) «під високим вакуумом»: висушування над фосфору(V) оксидом Р за тиску не більше 0.1 кПа і температури, зазначеної в окремій статті.

Якщо зазначені інші умови, використовується методика повністю описується в окремій статті.

Л

► **Методика**<sup>(1)</sup>. Зазначену в окремій статті кількість випробовуваної речовини перемішують. Якщо випробовуваний зразок перебуває у вигляді великих частинок, розмір частинок перед зважуванням зменшують близько до 2 мм шляхом швидкого подрібнення. Випробовуваний зразок поміщають у зважений бюкс, закривають кришку і, після зважування бюксу із вмістом, легким поперечним струшуванням розподіляють випробовуваний зразок рівномірно шаром товщиною близько 5 мм (не більше 10 мм для рихлих речовин), якщо немає інших зазначень в окремій статті. ▲

### 2.2.34. ТЕРМІЧНИЙ АНАЛІЗ

Термічний аналіз поєднує групу методів, за допомогою яких визначається залежність зміни різних фізичних властивостей речовин від температури. Звичайно у більшості використовуваних методів визначають зміну енергії або маси випробовуваного зразка.

#### ТЕРМОГРАВІМЕТРІЯ

Термогравіметрія являє собою метод, за допомогою якого реєструють зміну маси випробовуваного зразка в залежності від температури, що змінюється відповідно до контрольованої програми.

(1) Використано матеріали загальної статті < 731 > «Loss on Drying» Фармакопеї США

**Прилад.** Основними складовими частинами термовагів є: пристрій для нагрівання або охолодження речовини відповідно до заданої температурної програми, комірка для зразка з контрольованими параметрами атмосфери, електроваги та реєструючий пристрій. До приладу може бути приєднаний пристрій для аналізу летких речовин.

**Верифікація температурної шкали.** Проводять перевірку температурної шкали відповідно до інструкції виробника з використанням підходящого матеріалу.

**Верифікація електровагів.** Відповідну кількість підходящого сертифікованого стандартного зразка (наприклад, кальцію оксалату моногідрату ФСЗ) поміщають у комірку для зразка та реєструють його масу. Починають нагрівання зразка із програмованою зміною температури відповідно до інструкції виробника. Реєструють термогравіметричну криву: показання температури або часу відкладається по осі абсцис зі зростанням значень зліва направо; показання маси відкладається по осі ординат зі зростанням значень знизу вгору. При температурі близько 230 °С підвищення температури припиняють. На кривій залежності маси від температури або маси від часу вимірюють відстань між початковим і кінцевим плато, що відповідає втрате в масі зразка. Втрата в масі для сертифікованого матеріалу порівняння зазначена у маркуванні.

**Методика.** Використовують аналогічну послідовність проведення операцій для випробовуваної субстанції відповідно до умов, зазначених в окремій статті. Втрату в масі випробовуваного зразка визначають, вимірюючи відстань між початковим і кінцевим плато на одержаній термогравіметричній кривій. Втрату в масі  $\Delta$  виражають у відсотках (м/м).

За регулярного використання приладу періодично проводять калібрування та верифікацію температурної шкали. А якщо ні, то такі перевірки здійснюють перед кожним вимірюванням.

Оскільки параметри атмосфери, в якій здійснюється випробування, є критичними, для кожного визначення відмічають: тиск або швидкість потоку, склад газової суміші.

#### ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА СКАНУВАЛЬНА КАЛОРИМЕТРІЯ

Диференціальна сканувальна калориметрія (ДСК) являє собою метод, що дозволяє простежити за енергетичними процесами, що відбуваються при нагріванні (або охолодженні) речовини (або суміші речовин) і визначити зміну ентальпії та питомої теплоємності, а також відповідні їм значення температури.

Метод використовується для визначення різниці в кількостях тепла, що виділяється або поглинається випробовуваним зразком і коміркою порівняння, в

залежності від температури. Придатні два різновиди ДСК-приладів: прилади з компенсацією потужності для підтримки нульової різниці температур між випробовуваним зразком і зразком порівняння; і прилади з використанням постійної швидкості нагрівання та визначенням температурного диференціала як різниці теплових потоків між зразком і зразком порівняння.

**Прилад.** ДСК-прилад із компенсацією потужності складається з печі, що містить тримач зразка з коміркою порівняння і коміркою для зразка порівняння. ДСК-прилад із тепловим потоком складається із печі, що містить одну комірку із тримачем для тигля зі зразком порівняння і тигля з випробовуваним зразком.

До приладів приєднані: пристрій для програмування температури, термодетектор(и) і система записування, що може бути поєднана з комп'ютером. Вимірювання проводять при контрольованих параметрах атмосфери.

**Калібрування приладу.** Прилад калібрують за змінами температури й ентальпії, використовуючи індій високої чистоти або будь-які інші підходящі сертифіковані матеріали, відповідно до інструкції виробника приладу. Для контролю лінійності може бути використана комбінація 2 металів, наприклад, індію та цинку.

**Порядок експлуатації приладу.** Відповідну кількість випробовуваної речовини зважують у підходящому тиглі та поміщають у тримач зразка. Встановлюють початкову та кінцеву температури та швидкість нагрівання відповідно до умов випробування, зазначених в окремій статті.

Починають аналіз і реєструють криву диференціального термічного аналізу: показання температури або часу відкладається по осі абсцис зі зростанням значень зліва направо; показання енергії відкладається по осі ординат (з характеристикою зміни – ендотермічна або екзотермічна).

Температура, за якої відбувається процес (початкова температура), відповідає перетинанню (А) продовження базової лінії з дотичною у точці найбільшого нахилу (точка перегину) кривої (див. Рис.2.2.34.-1). Закінчення термічного процесу визначають за найвищою точкою на кривій.

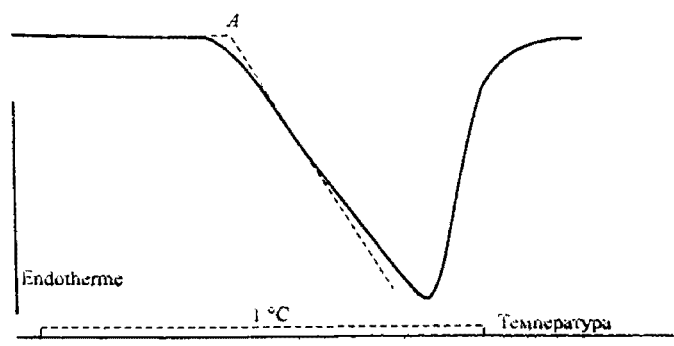


Рисунок 2.2.34.-1 Термограма

Значення ентальпії процесу пропорційне значенню площі під кривою, що обмежена базовою лінією; коефіцієнт пропорційності визначається за результатами вимірювання теплоти плавлення відомої речовини (наприклад, індію) за таких самих умов визначення.

Кожна термограма може супроводжуватися такими даними: умови випробування, запис про останнє калібрування, маса наважки зразка та його ідентифікація (включаючи термічну історію), контейнер, атмосфера (склад, швидкість потоку, тиск), напрямок і швидкість температурних змін, прилад і чутливість записуючого пристрою.

### Застосування

**Дослідження фазових переходів:** визначення температури, змін теплоємності й ентальпії фазових переходів випробовуваної речовини в залежності від температури.

Зміна агрегатного стану	Структурні зміни
тверда речовина - тверда речовина	алотропія - поліморфізм
	склування
	десольватація
	аморфний - кристалічний
тверда речовина - рідина	плавлення
тверда речовина - газ	сублімація
рідина - тверда речовина	тверднення
	перекристалізація
рідина - газ	паротворення

**Зміна хімічного складу.** Вимірювання теплоти та температури реакції за даних експериментальних умов для того, щоб, наприклад, визначити кінетику розкладання або десольватації.

**Застосування фазових діаграм.** Створення фазових діаграм для сумішей твердих речовин. Створення фазових діаграм може бути важливим етапом при розробці складу і оптимізації процесу охолодження - висушування.

**Визначення ступеня чистоти.** Вимірювання теплоти плавлення та точки плавлення методом ДСК дозволяє визначити вміст домішок у випробовуваній речовині з однієї термічної діаграми, при цьому потрібне використання тільки декількох міліграмів зразка при відсутності необхідності повторних правильних вимірювань справжньої температури.

Теоретично плавлення цілком кристалічної чистої субстанції за постійного тиску характеризується теплою плавлення  $\Delta H$ , у нескінченно вузькому діапазоні, відповідному точці плавлення  $T_0$ . Розширення цього діапазону – чутливий індикатор наявності домішок. Тому зразки однієї речовини, у яких вміст домішок варіює на декілька десятків відсотка, дають термічні діаграми, що візуально розрізняються (див. Рис. 2.2.34.-2).

Визначення молярної чистоти методом ДСК засновано на математичній апроксимації інтегральної

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

Форми рівняння Вант-Гоффа, застосовуваного до концентрацій (не до активностей) у бінарній системі  $[\ln(1-x_2) = -x_2]$  і  $T \times T_0 = T_0^2$ :

$$T = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \times x_2 \quad (1)$$

де:

$x_2$  — мольна частка домішки, а саме - число молекул домішки, ділене на загальне число молекул у рідкій (або розплавленій) фазі за температури  $T$  (у Кельвінах);

$T_0$  — температура плавлення хімічно чистої речовини, у Кельвінах;

$\Delta H_f$  — молярна теплота плавлення речовини, у Джоулях;

$R$  — газова стала для ідеального газу, у Джоуль-Кельвінах $^{-1}$ ·моль $^{-1}$ .

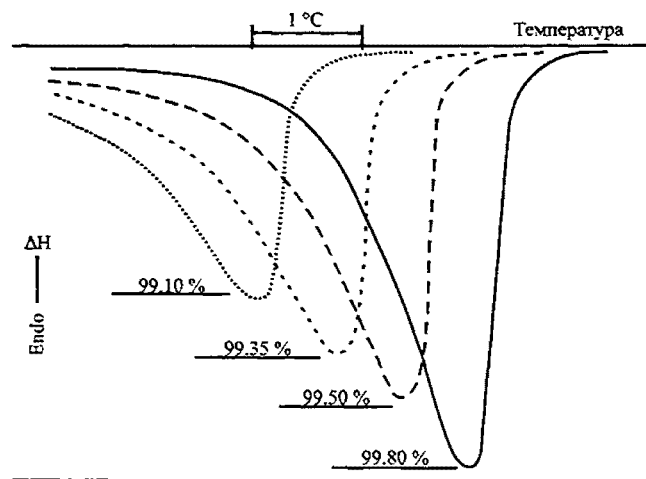


Рисунок 2.2.34.-2. Термічні діаграми, відповідні зразкам речовини різного ступеня чистоти

Визначення чистоти методом ДСК обмежене визначенням домішок, що утворюють евтектичну суміш з основною речовиною, і наявних у випробовуваній речовині у мольній фракції менше 2 %.

Метод не може бути використаний для аналізу:

- аморфних речовин;
- сольватів або поліморфних сполук, нестабільних у зазначеному у випробуванні температурному діапазоні;
- домішок, що утворюють тверді розчини з основною речовиною;
- домішок, нерозчинних у рідкій фазі або у розплаві основної речовини.

У процесі нагрівання випробовуваної речовини домішка цілком розплавляється при температурі плавлення евтектичної суміші. Вище цієї температури у твердій фазі міститься тільки чиста речовина. У міру підвищення температури від температури евтектичної суміші до температури плавлення чистої субстанції мольна частка суміші у рідині постійно знижується, в той час як мольна частка чистої розплавленої речовини постійно зростає. Для усіх значень температури, що перевищують точку евтектики:

$$x_2 = \frac{1}{F} \times x_2^* \quad (2)$$

де:

$F$  — частка розплавленої фракції випробовуваної речовини;

$x_2^*$  — мольна частка суміші у випробовуваному зразку.

Якщо весь зразок розплавиться,  $F=1$  і  $x_2 = x_2^*$ .

Якщо рівняння (2) об'єднати з рівнянням (1), одержимо таке рівняння:

$$T = T_0 - \frac{x_2^* RT_0^2}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

Значення теплоти плавлення одержують шляхом інтегрування площі піка плавлення.

Температуру плавлення ( $T_0$ ) чистої речовини одержують екстраполяцією з графіка залежності температури, вираженої у Кельвінах, від  $1/F$ .

Значення кута  $\alpha$  нахилу прямої, одержаної після лінеаризації (якщо необхідно), відповідає  $RT_0^2 \frac{x_2}{\Delta H_f}$ , що дозволяє оцінити величину  $x_2$ .

Мольну частку загального вмісту евтектичних домішок у випробовуваній речовині, у відсотках, визначають шляхом множення значення  $x_2$  на 100.

### ТЕРМОМІКРОСКОПІЯ

Фазові переходи можуть бути виявлені за допомогою термомікроскопії - методу, що дозволяє досліджувати зразок, підданий програмованій зміні температури, у поляризованому світлі під мікроскопом.

Спостереження, проведені з використанням термомікроскопії, дозволяють чітко ідентифікувати природу процесу, виявленого з використанням термогравіметрії та диференціального термічного аналізу.

**Прилад.** Прилад складається із мікроскопа, з'єданого з поляризатором світла, поверхні нагрівання, пристрою, що програмує температуру і швидкість нагрівання або охолодження, і системи, що записує значення температур переходів. Прилад може бути додатково споряджений відеокамерою і відеомагнітофоном.

N

Методи термічного аналізу використовують для:

- створення оптимальних умов процесів синтезу та аналізу лікарських речовин;
- фармацевтичної розробки та пошуку оптимального складу готових лікарських засобів;
- оцінки якості лікарських субстанцій і матеріалів для виробництва контейнерів для пакування готових лікарських засобів;

— визначення і контролю критичних точок технологічних процесів виробництва готових лікарських засобів.

Термічні методи аналізу, як правило, не вимагають великих кількостей речовин і нетривалі за часом визначення. Тому, наприклад, визначення втрати в масі при висушуванні методом термогравіметрії проводять для дорогих субстанцій.

## ТЕРМОГРАВІМЕТРІЯ

**Прилад.** Звичайно у термовагах використовують інертну (азот або аргон) або окисну (повітря або кисень) атмосферу.

### Застосування

*Розробка умов проведення аналітичних методик.* Точне визначення умов висушування або прожарювання аналітичних осадів.

*Кількісний аналіз.* Дослідження термограм багатокомпонентної суміші дає можливість визначити компоненти суміші та розрахувати їх кількості у випробовуваному зразку.

*Кінетичні дослідження.* Вивчення реакцій розкладання, що протікають при сталій температурі.

*Визначення вмісту води у пробі.* Одержання інформації щодо природи води, що міститься, — адсорбована чи структурна.

Часто буває корисним порівняти термогравіметричну криву з термогравіметричною кривою за похідною, на якій більш чітко окреслюються відповідні ділянки. Такий аналіз має назву *диференціальної термогравіметрії* (ТГП).

## ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА СКАНУВАЛЬНА КАЛОРИМЕТРІЯ

Диференціальна сканувальна калориметрія (ДСК) є одним із варіантів класичного диференціального термічного аналізу (ДТА), який дозволяє простежити за змінами у випробовуваному зразку на підставі вимірювання поглиненої або виділеної теплоти. На відміну від класичного методу ДТА ДСК дозволяє одержати не тільки якісні дані щодо температур і напрямків переходів, але й кількісні дані. Площа під піком кривої ДСК відповідає кількості енергії, витраченої на підтримання ізотермічних умов. При цьому розходження у теплопровідності, теплоємності й інших параметрах нівелюються.

## ДЕРИВАТОГРАФІЯ

Одночасне поєднання різних методів термічного аналізу або послідовне застосування методу терміч-

ного аналізу з іншими фізико-хімічними методами має назву *комбінованих методів термічного аналізу*.

Одночасна реєстрація кривих термогравіметричного визначення (ТГ), диференціального термічного аналізу (ДТА), а часто й диференціального термогравіметричного аналізу (ДТГ) називається *дериwатографією*. Одночасна реєстрація зміни маси зразка і процесів, що супроводжуються виділенням або поглинанням тепла, дозволяє істотно розширити можливість застосування цих методів.

## ТЕРМОМІКРОСКОПІЯ

**Прилад.** Використання комбінованого обладнання дозволяє поєднувати методи термомікроскопії з іншими методами термічного аналізу. Наприклад, фотовізуальна диференціально-скануюча калориметрія.

Обладнання для високотемпературної мікроскопії, що споряджене додатковими пристроями для проведення випробувань у широкому діапазоні програмованих значень температури і створення бази даних, дозволяє визначати та підтверджувати характеристики лікарських субстанцій, допоміжних речовин або готових лікарських форм.

### 2.2.41. КРУГОВИЙ ДИХРОЇЗМ

Круговий дихроїзм оптично активних речовин — відмінність у поглинанні для світла з лівою і правою круговою поляризацією в межах смуги поглинання.

Пряме вимірювання дає середню алгебраїчну величину:

$$\Delta A = A_L - A_R,$$

де:

$\Delta A$  — оптична густина кругового дихроїзму;

$A_L$  — оптична густина для світла з лівою круговою поляризацією;

$A_R$  — оптична густина для світла з правою круговою поляризацією.

Величину кругового дихроїзму розраховують за рівнянням:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \times l},$$

де:

$\Delta \varepsilon$  — молярний круговий дихроїзм або молярний диференціальний дихроїзм, або молярний диференціальний дихроїчний показник поглинання у л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>;

$\varepsilon_L$  — молярний показник поглинання (2.2.25) для світла з лівою круговою поляризацією;

$\varepsilon_R$  — молярний показник поглинання для світла з правою круговою поляризацією;

$c$  — концентрація випробовуваного розчину, у моль·л<sup>-1</sup>;



## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

$l$  — довжина оптичного шляху, у см.

Також для характеристики кругового дихроїзму можуть бути використані такі показники:

*Фактор дисиметрії:*

$$g = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon},$$

де:

$\varepsilon$  — молярний показник поглинання (2.2.25).

*Молярна еліптичність:*

Деякі типи приладів безпосередньо реєструють величину еліптичності  $\Theta$ , у градусах ( $^\circ$ ). При використанні таких приладів величина молярної еліптичності  $[\Theta]$  може бути розрахована за рівнянням:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times l \times 10},$$

де:

$[\Theta]$  — молярна еліптичність, в  $(^\circ) \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$ ;

$\Theta$  — величина еліптичності, що реєструється приладом;

$M$  — відносна молекулярна маса випробовуваної речовини;

$c$  — концентрація випробовуваної речовини, в г/мл;

$l$  — довжина оптичного шляху, у см.

Величина молярної еліптичності також пов'язана з величиною молярного кругового дихроїзму випробовуваної речовини таким рівнянням:

$$[\Theta] = 2.303 \Delta\varepsilon \frac{4500}{\pi} \approx 3300 \Delta\varepsilon$$

Молярну еліптичність часто використовують при аналізі білків і нуклеїнових кислот. У цьому разі молярну концентрацію, виражену в одиницях молярних залишків, розраховують за формулою:

$$\frac{\text{молекулярна маса}}{\text{число амінокислот}}$$

Середня відносна молекулярна маса мономерного залишку складає від 100 до 120 (звичайно 115) для

білків і близько 330 — для нуклеїнових кислот (у вигляді натрієвої солі).

**Прилад.** Джерелом світла (S) є ксеонова лампа (Рис. 2.2.41.-1), світло проходить крізь подвійний монохроматор (M), забезпечений кварцовими призмами (P1, P2).

Лінійний промінь з першого монохроматора розділяється на 2 компоненти, які поляризуються під правим кутом другим монохроматором. Екстраординарний промінь усувається за допомогою вихідної щілини монохроматора.

Поляризоване монохроматичне світло проходить крізь двопротенезаломлюючий модулятор (Cr): у результаті утворюється модульоване світло з круговою поляризацією.

Потім промінь проходить крізь випробовуваний зразок (C) і потрапляє на фотопомножувач (P.M.), за яким іде підсилювач, що спричиняє два електричні сигнали: один постійного струму  $V_c$ , а інший змінного струму з частотою модуляції  $V_{ac}$ , характерною для випробовуваного зразка. Фаза є показником кругового дихроїзму. Відношення  $V_{ac}/V_c$  пропорційне диференціальному поглинанню  $\Delta A$ , що створює сигнал. За допомогою дихрографа звичайно можна проводити вимірювання у діапазоні довжин хвиль від 179 нм до 800 нм.

**Калібрування приладу.** *Правильність шкали оптичної густини.* 10.0 мг ізоандростерону R розчиняють у діоксані P і об'єм розчину доводять тим самим розчинником до 10.0 мл. Записують спектр кругового дихроїзму одержаного розчину за довжини хвилі від 289 нм до 360 нм. Величина  $\Delta\varepsilon$ , виміряна в максимумі за довжини хвилі 394 нм, дорівнює +3.3. Також може бути використаний розчин (1S)-(+)-10-камфоросульфонової кислоти P.

*Лінійність модуляції.* 10.0 мг (1S)-(+)-10-камфоросульфонової кислоти P розчиняють у воді P і об'єм розчину доводять тим самим розчинником до 10.0 мл. Точну концентрацію камфоросульфонової кислоти в розчині визначають методом УФ-спектрометрії (2.2.25), використовуючи величину

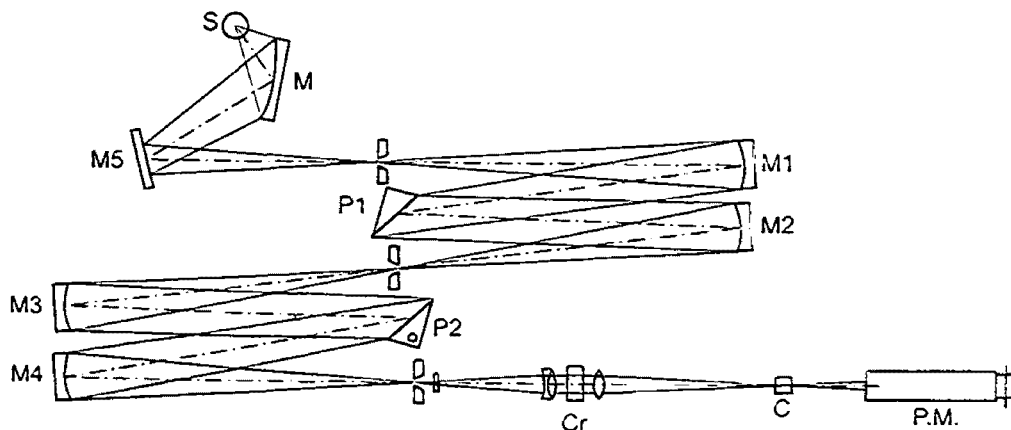


Рисунок 2.2.41.-1. Оптична схема дихрографа

питомого показника поглинання 1.49 за довжини хвилі 285 нм.

Записують спектр кругового дихроїзму розчину за довжини хвилі від 185 нм до 340 нм. Величина  $\Delta\epsilon$ , виміряна в максимумі за довжини хвилі 290.5 нм, дорівнює від +2.2 до +2.5, а виміряна в максимумі за довжини хвилі 192.5 нм — від (-4.3) до (-5).

Може бути використаний (1S)-(+)-або його оптичний антипод (1R)-(-)-амонію 10-камфоросульфонат Р.

## 2.2.42. ГУСТИНА ТВЕРДИХ РЕЧОВИН

Густина твердих речовин відповідає їх середнім масам на одиницю об'єму і звичайно виражається у грамах на сантиметр кубічний ( $\text{г/см}^3$ ), хоча Міжнародна Одиниця — кілограм на метр кубічний ( $1\text{г/см}^3=1000\text{кг/м}^3$ ).

На відміну від газів і рідин, густина яких залежить лише від температури та тиску, густина твердих речовин також залежить від їх будови і, отже, залежить від їх кристалічної структури та ступеня кристалічності.

Якщо тверда речовина аморфна або частково аморфна, її густина може додатково залежати від її виготовлення та обробки.

Тому, на відміну від флюїдів (плинних середовищ), густини 2 хімічно еквівалентних твердих речовин можуть бути різними, і ця різниця пов'язана з відмінностями в структурах речовин у твердому стані. Густина складових частинок є важливою фізичною характеристикою порошків для фармацевтичного застосування.

Густина частинок твердої речовини може бути виражена різними величинами залежно від методу, що використовується при вимірюванні об'єму частинок. Для зручності розрізняють 3 рівні вираження густини:

- *дійсна густина*, при визначенні якої враховують лише тверду фракцію речовини; у разі кристалічних речовин дійсну густина також називають *кристалічною густиною*;
- *густина частинок*, при визначенні якої також враховують і об'єм пір усередині частинок;
- *насіпна густина*, при визначенні якої додатково враховують об'єм порожнин між частинками, сформованих шаром порошку; насіпну густина також називають *уявною густиною*.

## ДІЙСНА ГУСТИНА

Дійсна густина речовини є відношенням маси до одиниці об'єму елементарної комірки, за винятком усіх порожнин, що не є основною частиною молекулярної структури. Дійсна густина є характерною властивістю певної кристалічної структури речовини і, відповідно, не має залежати від методу визначення. Дійсна густина може бути визначена розрахунковим методом.

Дійсну густина одержують із використанням кристалографічних даних (розмір і структура елементарної комірки), наприклад, за даними рентгенівської дифракції або монокристала або уточненням кристалічної структури за даними рентгенівської дифракції порошків.

## ГУСТИНА ЧАСТИНОК

Гранулометрична густина частинок зумовлена як дійсною густиною, так і внутрішньочастковою пористістю (закриті і/або експериментально недоступні відкриті пори). Таким чином, густина частинок залежить від величини визначуваного об'єму, який у свою чергу залежить від методу вимірювання. Густина частинок може бути визначена з використанням одного із 2 наведених нижче методів.

*Пікнометричну густина* визначають вимірюванням об'єму, зайнятого відомою масою порошку, що еквівалентна об'єму газу, витісненого порошком із використанням пікнометра (2.9.23). При вимірюванні пікнометричної густини визначуваній об'єм виключає об'єм відкритих пір; однак він включає об'єм, зайнятий закритими порами або порами, недоступними для газу. При виборі газу перевага надається гелію, бо через його високий коефіцієнт дифузії більшість відкритих пір доступні для даного газу. Таким чином, величина пікнометричної густини тонко здрібненого порошку, як правило, істотно не відрізняється від величини дійсної густини. Отже, така густина є кращою оцінкою дійсної густини аморфних або частково кристалічних зразків і з цієї причини широко застосовується для зразків технологічно оброблених порошків для фармацевтичного застосування.

*Ртутно-порозиметричну густина* також називають *гранулярною густиною*. Об'єм, що визначається даним методом, також включає об'єм, зайнятий закритими порами або порами, недоступними для ртуті; проте він включає об'єм тільки тих відкритих пір, розмір яких менший за деяку межу. Дана межа розміру пір або мінімальний діаметр доступу залежить від максимального ртутного інтрузійного тиску, застосовуваного під час визначення; при цьому при нормальному робочому тиску ртуть не проходить крізь найдрібніші пори, доступні гелію. Для одного зразка можуть бути одержані різні значення гранулярної густини, бо для кожного застосовуваного ртутного інтрузійного тиску густина може бути визначена при відповідній межі розміру пір за даного тиску.

## НАСІПНА ГУСТИНА ТА ГУСТИНА ПІСЛЯ УСАДКИ

Насіпна густина порошку включає об'єм порожнин між частинками. Тому насіпна густина залежить як від густини частинок порошку, так і від просторового розташування частинок у шарі порошку.

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

Насипну густину порошку часто дуже складно виміряти з достатньою відтворюваністю результатів, бо незначне порушення його шару може призвести до одержання іншого значення густини. Отже, важливо при поданні даних специфікувати, яким чином було проведено визначення.

Насипну густину та густину після усадки визначають, як зазначено в загальній статті (2.9.34. «Насипна густина і густина після усадки»).

### 2.2.48. РАМАНІВСЬКА СПЕКТРОМЕТРІЯ

Раманівська спектроскопія (непружне розсіяння світла) — це процес світлорозсіяння, що відбувається при дії на випробовуваний зразок інтенсивного монохроматичного випромінювання (звичайно лазерного), і вимірювання зсуву частоти випромінювання, що розсіюється зразком.

Раманівська спектроскопія й інфрачервона спектроскопія є взаємодоповнюючими у тому сенсі, що з використанням обох методів досліджують коливання молекул речовини. Проте раманівська спектроскопія відрізняється від інфрачервоної спектроскопії за відносною чутливістю для різних функціональних груп. Раманівська спектроскопія особливо чутлива до неполярних зв'язків (наприклад, С-С зв'язки, одинарні або кратні) і менш чутлива до полярних зв'язків. Тому вода, яка має сильне поглинання в інфрачервоній області, дає слабе раманівське розсіяння і, відповідно, добре підходить як розчинник для раманівської спектроскопії.

*Прилад.* Спектроскопи для отримання раманівських спектрів звичайно включають такі складові частини:

- джерело монохроматичного випромінювання, звичайно лазер з довжиною хвилі в ультрафіолетовій, видимій або ближній інфрачервоній області спектра;
- підхожа оптична система (лінзи, дзеркала або волоконно-оптична система), за допомогою якої спрямовується на зразок збуджуюче випромінювання і збирається розсіяне зразком світло;
- оптичний пристрій (монохроматор або фільтр), який пропускає розсіяне випромінювання, зміщене за частотою (раманівське розсіяння), і затримує інтенсивне розсіяне випромінювання, частота якого дорівнює частоті падаючого випромінювання (релеєвське розсіяння), перешкоджаючи його попаданню на детектор;
- дисперсійний пристрій (дифракційні ґрати або призмий монохроматор) у поєднанні зі щільною з вибірковою за довжиною хвилі і детектором (звичайно фотоелектронний помножувач);

або

- дисперсійний пристрій (дифракційні ґрати або призма) у поєднанні з багатоканальним детектором (звичайно прилад із зарядовим зв'язком (ПЗЗ));

або

- інтерферометр з детектором, що реєструє інтенсивність розсіяного світла в часі, і пристрій обробки даних, який трансформує дані шляхом Фур'є-перетворення в діапазон значень частоти або хвильових чисел.

### ПРОБОПІДГОТОВКА

Раманівські спектри можуть бути отримані для твердих речовин, рідин і газів як безпосередньо, так і в скляних контейнерах або трубках, звичайно без попередньої обробки або розчинення зразка.

Основним обмеженням раманівської спектроскопії є можлива флуоресценція домішок, що заважає детектору реєструвати значно більш слабкіший раманівський сигнал. Флуоресценції можна уникнути шляхом вибору джерела збуджуючого лазерного випромінювання з великим значенням довжини хвилі, наприклад, таким, що знаходиться в ближній інфрачервоній області спектра. Інтенсивність деяких раманівських ліній може бути посилена низкою способів, наприклад, шляхом використання резонансної раманівської спектроскопії (РР) або поверхнево-посиленою раманівською спектроскопією (SERS).

У зв'язку з вузьким фокусуванням падаючого лазерного променя спектр звичайно отримують з використанням лише декількох мікролітрів зразка. Тому слід брати до уваги неоднорідність зразка, якщо тільки об'єм зразка не збільшений, наприклад, шляхом його обертання.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ СТАНДАРТНИХ ЗРАЗКІВ

Проводять пробопідготовку випробовуваної речовини і стандартного зразка за аналогічними методами і записують їх спектри в однакових умовах. Максимуми в спектрі, отриманому для випробовуваної речовини, мають відповідати за положенням і відносною інтенсивністю відповідним максимумам у спектрі, отриманому для стандартного зразка (ФСЗ).

При відмінності в положеннях максимумів у спектрах, отриманих для випробовуваної речовини і стандартного зразка в твердому стані, проводять аналогічну обробку випробовуваної речовини і стандартного зразка так, щоб вони перекристалізувалися і/або утворили однакову форму, або вчиняють, як зазначено в окремій статті, а потім записують спектри.

Незважаючи на те, що закон Бера-Ламберта для раманівської спектроскопії не виконується, інтенсивність раманівського розсіяння прямо пропорційна концентрації розсіюючих частинок. Як і для інших

спектроскопічних методів, кількісне визначення може бути проведене з використанням відомих кількостей або концентрацій стандартних зразків. Унаслідок невеликого просторового розрізнення, характерного для даного методу, необхідно забезпечувати репрезентативність для стандартних і випробовуваних зразків, наприклад, бути упевненим у тому, що вони є в одному і тому самому фізичному стані, або використовувати внутрішній стандарт для рідких зразків.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ СПЕКТРАЛЬНИХ БІБЛІОТЕК І СТАТИСТИЧНИХ МЕТОДІВ КЛАСИФІКАЦІЇ І КАЛІБРУВАННЯ

*Контроль робочих характеристик приладу.* Експлуатацію приладу проводять відповідно до інструкцій виробника приладу і виконують зазначені калібрування і тестування функціональних характеристик системи через регулярні інтервали часу залежно від застосування приладу і випробовуваних речовин. При використанні раманівської спектрометрії для кількісних визначень або при установці спектральних бібліотек порівняння для (хемометричної) класифікації або калібрування слід переконатися в тому, що зроблені необхідні поправки і/або вимірювання для контролю варіабельності значень хвильових чисел й інтенсивностей відгуку приладу.

*Верифікація шкали хвильових чисел.* Шкалу хвильових чисел раманівських зсувів частоти (зазвичай виражену в сантиметрах зворотних) верифікують із використанням підхожих стандартів, які мають характеристичні максимуми при досліджуваних величинах хвильових чисел (наприклад, органічна речовина, неонна лампа або лінії Ag<sup>+</sup> плазми від аргон-іонного лазера).

Калібрування приладу має відповідати типу зразка, тобто для твердих випробовуваних зразків слід використовувати тверді стандартні зразки, а для рідких випробовуваних зразків – рідкі стандартні зразки. Вибирають підхожу речовину (наприклад, інден, циклогексан або нафталін) з точно встановленими значеннями зсувів хвильових чисел (див. Табл. 2.248.-1). Зразок індену для запобігання його деструкції переважно поміщають у пробірку для ЯМР, яку вакуумують і герметично закупорюють в атмосфері інертного газу, а потім зберігають у прохолодному і темному місці.

*Верифікація шкали інтенсивностей відгуку приладу.* На абсолютні і відносні величини інтенсивностей смуг комбінаційного розсіяння робить вплив низка чинників, що включають:

- рівень поляризації впливаючого випромінювання;
- рівень поляризації збираючої оптики;
- інтенсивність впливаючого випромінювання;
- відмінності у відгуку приладу;

- відмінності у фокусі і геометричній формі зразка;
- відмінності в щільності упаковки для твердих зразків.

Відповідні критерії прийнятності варіюють залежно від конкретного застосування, але зазвичай допустимі відхилення відносних величин інтенсивностей смуг  $\pm 10\%$ .

*Установка бібліотеки спектрів порівняння.* Записують спектри підхожої кількості субстанцій, що пройшли повне тестування (наприклад, як зазначено в окремій статті) і які мають відмінності (виробник, серія, кристалічна модифікація, розмір частинок і т.д), характерні для випробовуваної субстанції. За допомогою інформації, отриманої для даного ряду спектрів, встановлюють межі ідентичності або межі кількісного визначення, які можуть бути використані, наприклад, для ідентифікації субстанції або контролю її кількості, що утворилася в процесі виробництва. Число субстанцій у базі даних залежить від конкретного застосування. Колекція спектрів у базі даних може бути представлена різними способами, визначуваними математичною методикою, використовуваною для класифікації або кількісного визначення.

Таблиця 2.2.48.-1

*Зсуви значень хвильових чисел (і межі допустимих відхилень для циклогексану, індену і нафталіну)*

циклогексан <sup>A</sup>	інден <sup>B</sup>	нафталін <sup>A</sup>
		3 056.4(±1.5)
2 938.3 (±1.5)		
2 923.8 (±1.5)		
2 852.9 (±1.5)		
	1 609.7 (±1.0)	1 576.6 (±1.0)
1444.4 (±1.0)	1 552.6 (±1.0)	1464.5 (±1.0)
1266.4 (±1.0)	1 205.2 (±1.0)	1382.2 (±1.0)
1157.6 (±1.0)		1147.2 (±1.0)
1028.3 (±1.0)	1018.6 (±1.0)	1021.6 (±1.0)
801.3 (±1.0)	730.5 (±1.0)	763.8 (±1.0)
	533.9 (±1.0)	513.8 (±1.0)

<sup>A</sup> *Standard guide for Raman shift standards for spectrometer calibration* (American Society for Testing and Materials ASTM E 1840).

<sup>B</sup> D.A. Carter, W.R. Thompson, C.E. Taylor and J.E. Pemberton, *Applied Spectroscopy*, 1995, 49 (11), 1561-1576.

У процесі валідації має бути встановлена вибірна здатність бази даних, що дозволяє позитивно ідентифікувати дану субстанцію і належним чином відрізнити її від інших субстанцій бази даних. Для упевненості в поточній придатності бази даних вибірна здатність має контролюватися через регулярні проміжки часу; особливо це необхідно після яких-небудь значних змін, що стосуються субстанції (наприклад, зміна постачальника або процесу виробництва субстанції), або при установці робочого режиму приладу для раманівської спектрометрії (наприклад, верифікація шкали хвильових чисел або відтворюваність відгуку спектрометра).

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

Потім база даних буде валідованою тільки для приладу, на якому проводилася її установка, або для подібного приладу, якщо підтверджена придатність для перенесеної на прилад бази даних.

**Методика.** Пробопідготовку і випробування зразка проводять таким самим чином, як при установці бази даних. Для оптимізації процесу порівняння спектрів можуть бути проведені підходи математичні перетворення раманівських спектрів і кількісних прогнозів.

Процес порівняння спектрів, перетворення спектрів або кількісних прогнозів властивостей, або кількостей цільової речовини в зразку може включати підходи хемометричні методи або методи статистичної класифікації, або калібрування.

### 2.2.49. ВИМІРЮВАННЯ В'ЯЗКОСТІ НА ВІСКОЗИМЕТРИ З ПАДАЮЧОЮ КУЛЬКОЮ

Вимірювання динамічної в'язкості Ньютонівських рідин з використанням підходячого віскозиметра з падаючою кулькою виконують при  $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , якщо немає інших зазначень в окремій статті. Визначають час, необхідний для падіння тестованої кульки у випробовуваній рідині від однієї кільцевої мітки до іншої. Якщо не встановлена більш суворя межа для використовуюваного приладу, результат вважають за придатний, якщо значення 2 послідовних вимірювань відрізняються не більш як на 1.5 %.

**Прилад.** Віскозиметр з падаючою кулькою має: скляну трубку, поміщену в кожух, який дозволяє проводити прецизійний контроль температури; шість кульок, виготовлених зі скла, нікельованого заліза або сталі з різними значеннями густини і діаметра. Трубка зафіксована так, що вісь трубки може відхилитися щодо вертикалі на  $(10 \pm 1)^\circ$ . Трубка має 2 кільцевих мітки, які визначають відстань падіння кульки. Наявні в продажі прилади забезпечені таблицями констант, значень густини кульок і інформацією про придатність різних кульок для передбачуваного діапазону значень в'язкості.

**Методика.** Наповнюють чисту суху заздалегідь термостатовану до температури  $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  трубку віскозиметра випробовуваною рідиною, уникаючи утворення бульбашок повітря. Вибирають кульку, підходу для даного діапазону в'язкості рідини, так, щоб одержати час падіння кульки не менше 30 сек. Закривають трубку і термостатують рідину при температурі  $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  протягом не менше 15 хв. Пропускають кульку крізь рідину між двома мітками без вимірювань. Потім знов опускають кульку і вимірюють за допомогою секундоміра з ціною поділки одна п'ята секунди, час, потрібний для того, щоб кулька опустилася від верхньої до нижньої кільцевої мітки. Випробування повторюють не менше 3 разів.

Динамічну в'язкість  $\eta$  розраховують у міліпаскаль-секундах, використовуючи формулу:

$$\eta = k(\rho_1 - \rho_2) \times t,$$

де:

$k$  — константа,  $\text{мм}^2/\text{сек}^2$ ;

$\rho_1$  — густина тестованої кульки,  $\text{г}/\text{см}^3$ ;

$\rho_2$  — густина випробовуваної рідини,  $\text{г}/\text{см}^3$ , одержана множенням її відносної густини  $d_{20}^{20}$  на 0.9982;

$t$  — час падіння кульки, сек.

### 2.2.54. ІЗОЕЛЕКТРОФОКУСУВАННЯ<sup>(2)</sup>

#### ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ

Ізоелектричне фокусування (ІЕФ; ІЕФ) — це метод електрофорезу, в якому розділення білків відбувається відповідно до їх ізоелектричних точок. Розділення проводять на пластині з поліакриламиду або агарозного гелю, що містить суміш амфотерних електролітів (амфолітів). При дії електричного поля амфоліти мігрують у гель, створюючи градієнт рН. У деяких випадках використовують гелі, що мають іммобілізований градієнт рН, отриманий шляхом включення слабких кислот або основ у певні місця гелю під час його приготування. Коли нанесені білки досягають фракції гелю, рН якої за значенням дорівнює їх ізоелектричній точці (pI), заряд білків нейтралізується і міграція припиняється. Градієнти можуть бути отримані в різних діапазонах рН залежно від вибраної суміші амфолітів.

#### ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ

У ізоелектричній точці сумарний заряд молекули білка дорівнює нулю, і молекула не може пересуватися в матриці гелю під дією електричного поля. Проте молекула білка в такому стані може переміщатися в результаті дифузії. У результаті дії градієнта рН білок залишається в ізоелектричному стані, таким чином відбувається його концентрація; цей ефект концентрації білка називається «фокусуванням». Збільшення напруги, що подається, або зменшення наважки проби покращує розділення смуг. Величина прикладеної напруги обмежується теплотою, що виділяється і яка має бути відведена. Використання тонких пластин гелю і пластин з ефективним охолодженням, контрольованим термостатичним циркулятором, запобігає підгоранню гелю і разом з цим забезпечує точне фокусування. Розділення оцінюють шляхом визначення мінімальної різниці pI ( $\Delta pI$ ), яка необхідна для розділення 2 сусідніх смуг, за рівнянням:

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(dpH : dx)}{E(-d\mu : dpH)}}$$

де:

(2) Дана стаття була переглянута відповідно до фармакопейної гармонізації. Див. статтю 5.8. «Фармакопейна гармонізація»

$D$  — коефіцієнт дифузії білка;

$\frac{dpH}{dx}$  — градієнт рН;

$E$  — напруженість електричного поля, у В/см;

$-\frac{d\mu}{dpH}$  — зміна рухливості розчиненої речовини в діапазоні рН, близькому до рІ.

Оскільки  $D$  і  $-\frac{d\mu}{dpH}$  для певного білка не можуть

бути змінені, розділення можна поліпшити, використовуючи вузький діапазон рН і збільшуючи напруженість електричного поля.

Розділення між смугами білків на гелі для ізоелектричного фокусування, що містить амфоліти-носії, може бути досить добрим. Поліпшити розділення можна, використовуючи іммобілізовані градієнти рН, що досягається використанням аналогічних амфолітам-носіям буферних речовин, співполімеризованих з матрицею гелю. При використанні гелю, що включає амфоліти-носії, можуть бути розділені білки, значення рІs яких відрізняються на 0.02 одиниць рН, тоді як використання фіксованих градієнтів рН дозволяє розділити білки, значення рІs яких відрізняються приблизно на 0.001 одиниць рН.

## ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ

Особливу увагу слід приділяти властивостям зразка і/або його приготуванню. Наявність солей в зразку може викликати проблеми, тому при приготуванні зразка рекомендується, якщо можливо, використовувати деіонізовану воду або 2 % розчин амфолітів, використовуючи, якщо необхідно, діаліз або гель-фільтрацію.

Час, необхідний для завершення фокусування в тонкому шарі поліакриламідних гелів, визначають шляхом нанесення забарвленого білка (наприклад, гемоглобіну) в різні області на поверхні гелю і застосуванням електричного поля: стабільний стан досягається, коли всі нанесення дають ідентичні смуги. У деяких протоколах завершення фокусування виражене як час, що минув після нанесення зразка.

ІЕФ на гелі може бути використане для ідентифікаційного випробування, коли мігруючий на гелі випробовуваний зразок порівнюють з підходящим стандартним зразком і калібрувальними білками ІЕФ; ІЕФ на гелі може бути використане для випробування на граничний вміст, коли густину смуги на ІЕФ гелі порівнюють, візуально, з густиною смуг, що з'являються при нанесенні стандартного зразка; або може бути використане як кількісне випробування, коли густину вимірюють, використовуючи денситометр або аналогічний прилад, кваліфікований для вимірювання відносної концентрації білка в ІЕФ смугах.

## ПРИЛАД

Прилад для ІЕФ складається з:

- регульованого генератора для створення постійного потенціалу, струму і потужності; використовують потенціали 2 500 В, які вважаються за оптимальні для використовуваних умов експлуатації; рекомендується джерело струму, що має постійну потужність до 30 Вт;
- камери для ІЕФ з твердого пластика, що містить охолоджувану пластину або придатний матеріал, що є основою для нанесення гелю;
- пластикової кришки з платиновими електродами, які з'єднані з гелем за допомогою паперових гнотів підхожої ширини, довжини і товщини, імпрегнованих розчинами анодного і катодного електролітів.

## ІЗОЕЛЕКТРИЧНЕ ФОКУСУВАННЯ В ПОЛІАКРИЛАМІДНИХ ГЕЛЯХ: ДЕТАЛІЗОВАНА МЕТОДИКА

*Наступна методика є детальним описом методики ІЕФ в тонких пластинах поліакриламідного гелю, використовуюваною, якщо немає інших зазначень в окремій статті.*

## ПРИГОТУВАННЯ ГЕЛІВ

**Матриця.** Матриця (див. Рис. 2.2.54.-1) складається зі скляної пластинки (А), на яку для полегшення роботи з гелем поміщена поліефірна плівка (В), з однієї або декількох прокладок (С), другої скляної пластинки (D) і затискачів, що сполучають конструкцію.

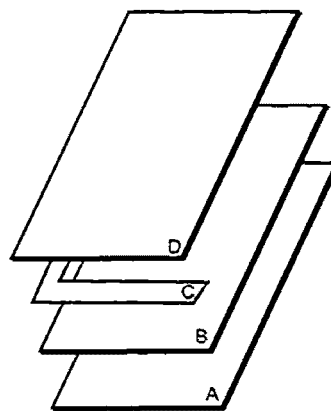


Рисунок 2.2.54.-1. Матриця

7.5 % поліакриламідний гель. 29.1 г акриламідну Р і 0.9 г метиленбісакриламідну Р розчиняють у 100 мл води Р. До 2.5 об'ємів отриманого розчину додають суміш амфолітів, зазначених в окремій статті, і доводять об'єм розчину до 10 об'ємів водою Р. Розчин ретельно перемішують і дегазують.

**Підготовка матриці.** Поліефірну плівку поміщають на нижню скляну пластинку, накладають прокладку,

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

помішають другу скляну пластинку і сполучають деталі затискачами. Перед використанням розчин поміщають на магнітну мішалку, додають 0.25 об'єму розчину 100 г/л *амонію персульфату Р* і 0.25 об'єму *тетраметилетиледіаміну Р*. негайно заповнюють розчином простір між скляними пластинками матриці.

### МЕТОДИКА

Матрицю розбирають на складові частини і, використовуючи поліефірну плівку, переносять гель на охолоджену підкладку, зволожену декількома мілілітрами піджої рідини, прагнучи уникати утворення повітряних бульбашок. Готують випробовуваний розчин і розчини порівняння, як зазначено в окремій статті. Для нанесення зразка поміщають смужки паперу розміром близько 10 мм×5 мм на поверхню гелю і імпрегнують кожну зазначеною кількістю випробовуваного розчину і розчину порівняння. Також наносять зазначену кількість розчину білків з відомими значеннями ізоелектричних точок як маркери рН для калібрування гелю. У деяких випадках замість імпрегнованих паперових смужок використовують гель, що має готові канавки, в які поміщають розчин зразка. Відрізають 2 смужки паперів завдовжки відповідно до довжини гелю й імпрегнують їх розчинами електролітів: кислотою для анода і лугом для катода. Склад анодного і катодного розчинів зазначають в окремих статтях. Ці паперові гнотики розміщують з кожного боку гелю на відстані декількох міліметрів від краю. Встановлюють кришку так, щоб електроди прийшли в контакт із смужками паперу (відповідно до анодного і катодного полюсів). Проводять ізоелектричне фокусування, використовуючи електричні параметри, зазначені в окремій статті. Коли рух суміші білків-стандартів стабілізується, електричний струм вимикають. За допомогою пінцета видаляють смужки, використувані для нанесення зразка, і 2 електродні гноти. Занурюють гель у *фіксуючий розчин для ізоелектричного фокусування у поліакриламідному гелі Р*. Витримують, обережно перемішуючи, при кімнатній температурі впродовж 30 хв. Розчин видаляють шляхом висушування і додають 200 мл *знебарвлюючого розчину Р*. Витримують при перемішуванні в перебігу 1 год. Гель висушують, додають *кумасі фарбувальний розчин Р*. Витримують упродовж 30 хв. Гель знебарвлюють за допомогою пасивної дифузії *знебарвлюючого розчину Р* доти, поки на чистому фоні не стануть добре видні смуги. Визначають положення і інтенсивність смуг на електрофореграмі, як зазначено в окремій статті.

### ЗМІНИ ДЕТАЛІЗОВАНОЇ МЕТОДИКИ (НАЛЕЖНІ ВАЛІДАЦІЇ)

За наявності в окремій статті посилання на загальну методику ізоелектричного фокусування можуть бути

внесені зміни в методологію або методіку ізоелектричного фокусування за умови валідації. Ці зміни включають:

- використання наявних у продажі гелів заводського виробництва а також забарвлюючих і знебарвлюючих наборів;
- використання іммобілізованих градієнтів рН;
- використання стрижневих гелів;
- використання касет гелю різних розмірів, включаючи ультратонкі (0.2 мм) гелі;
- зміни в методиці нанесення зразка, що включають різні об'єми зразка, або використання шаблонів для нанесення зразка, або гнотиків не з паперу;
- використання альтернативних умов проведення ізоелектрофокусування, що включають зміни електричного поля залежно від розмірів гелю і устаткування, а також використання фіксованих часів міграції, а не суб'єктивну інтерпретацію стабільності смуг;
- включення стадії попереднього фокусування;
- використання автоматизованого устаткування;
- використання гелів агарози.

### ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ІЗОЕЛЕКТРИЧНОГО ФОКУСУВАННЯ

При використанні методик, альтернативних деталізованої методиці, такі методики мають бути валідовані. Для валідації розділення можуть бути використані такі критерії:

- утворення стабільного рН-градієнта заданих характеристик, визначуваного, наприклад, за допомогою забарвлених рН-маркерів з відомими значеннями ізоелектричних точок;
- порівняння з електрофореграмою, отриманою для стандартного зразка, випробовуваного зразка;
- будь-які інші критерії валідації, зазначені в окремій статті.

### СПЕЦИФІКОВАНІ ЗМІНИ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ

Зміни загальної методики, необхідні для аналізу окремих субстанцій, можуть бути зазначені в деталях в окремих статтях. Зміни можуть включати:

- додавання в гель сечовини (як правило, 3 М концентрація розчину достатня для підтримки білка в розчиненому стані, але можуть бути використані розчини з концентрацією до 8 М): деякі білки в ізоелектричній точці випадають в осад; у такому разі до складу гелю вводиться сечовина, щоб білок залишився в розчиненому стані; при використанні сечовини для запобігання карбамойлювання білка мають застосовуватися тільки свіжі її розчини;
- використання альтернативних способів забарвлення;
- використання добавок до гелів, таких, як неіонні детергент або амфотерних детергентів (напри-

клад, CHAPS або CHAPSO), і додавання до зразка амфоліту для запобігання процесам агрегації і осадження білків.

## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Зразки можуть бути нанесені на будь-яку ділянку поверхні гелю, але для того, щоб захистити білки від надмірних значень рН операційного середовища, зразки не слід наносити близько як до одного, так і до іншого електрода. У процесі виконання методики аналітик може наносити білок на гель у трьох положеннях (посередині і на обидва кінці); смуги білка, нанесеного на протилежні кінці гелю, можуть бути не ідентичними.

Якщо фокусування в гелі відбувається занадто довго, може спостерігатися явище пониження градієнта рН з часом, яке називається катодним дрейфом. Причинами, що викликають катодний дрейф, можуть бути електроєдоосмос і абсорбція діоксиду вуглецю, хоча це поки однозначно не встановлено. Катодний дрейф спостерігається як переміщення фокусованого білка від катодного кінця гелю. Способом вирішення цієї проблеми може бути використання іммобілізованих градієнтів рН.

У процесі фокусування необхідно проводити ефективно охолодження (близько 4 °С) основи, на якій лежить гель. Високі значення напруги електричного поля, використовувані під час ізоелектричного фокусування, можуть призводити до перегріву і впливати на якість фокусованого гелю.

### 2.2.55. ПЕПТИДНЕ КАРТУВАННЯ<sup>(3)</sup>

Пептидне картування — це випробування на ідентифікацію білків, особливо одержаних із застосуванням технології *p*-ДНК (рекомбінантної ДНК). Випробування включає хімічну або ферментативну обробку білка, внаслідок чого одержують фрагменти пептидів, які потім розділяють і ідентифікують відтворним методом. Дане випробування є дуже селективним методом, за допомогою якого можлива ідентифікація майже будь-яких змін у послідовності індивідуальних амінокислот, які можуть бути наслідком, наприклад, точкових мутацій або неправильної трансляції послідовності комплементарної ДНК (*k*-ДНК). Пептидне картування є порівняльним методом, оскільки за отриманою інформацією порівняно з обробленим аналогічним способом стандартним зразком підтверджується первинна структура білка, відсутність змін у структурі білка, стійкість процесу і генетична стабільність. Кожен білок має унікальні властивості, які мають бути добре вивчені, щоб використовувати наукові підходи і методи аналізу дозволили розробити валідовані під-

ходи до пептидного картування, що забезпечують достатню специфічність.

Дана стаття є деталізованим посібником із застосування методу пептидного картування і його валідації для характеристики конкретних білків, для оцінки стабільності експресії конструкції клітин, використовуваних для продуктів, одержаних із застосуванням технології *P*-ДНК, оцінки стійкості всього процесу і стабільності продукту, а так само забезпечення ідентичності білка або визначення варіантного білка.

Пептидне картування не є загальним методом, воно передбачає розробку специфічних карт для кожного конкретного білка. Незважаючи на швидкий розвиток технології, є методи, загальні принципи яких прийнятні в цілому. Модифікації для цих методів конкретизують, якщо необхідно, в окремих статтях.

Пептидна карта може бути представлена у вигляді «відбитків пальців» білка і є кінцевим продуктом ряду хімічних процесів, які надають повну інформацію про ідентичність аналізованого білка. Для розробки методики необхідні 4 основних етапи: виділення і очищення білка, якщо білок входить до складу лікарської форми; селективне розщеплювання пептидних зв'язків; хроматографічне розділення пептидів; аналіз і ідентифікація пептидів. Випробований зразок піддають розщеплюванню і кількісному визначенню паралельно зі стандартним зразком. Повне розщеплювання з більшою ймовірністю відбувається, коли використовують такі ензими, як ендопротеази (наприклад, трипсин), замість хімічних розщеплюючих реагентів. Щоб бути показовою, пептидна карта має містити достатню кількість пептидів. З іншого боку, якщо фрагментів занадто багато, карта може втратити свою специфічність, оскільки багато білків матимуть подібні профілі.

## ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ

Виділення і очищення необхідні для аналізу нефасованих лікарських препаратів або дозованих лікарських форм, що містять допоміжні речовини і білки-носії, що заважають визначенню. Коли необхідно, виділення і очищення зазначається в окремій статті. Методика кількісного добування білка з дозованої лікарської форми має бути валідована.

## СЕЛЕКТИВНЕ РОЗЩЕПЛЮВАННЯ ПЕПТИДНИХ ЗВ'ЯЗКІВ

Вибір підходу, використовуваного для розщеплювання пептидних зв'язків, залежить від випробовуваного білка. Цей процес вибору включає визначення використовуваного типу розщеплювання, ферментативний або хімічний, і тип розщеплюючого агента всередині вибраної категорії. Низка розщеплюючих агентів і їх специфічність наведені в Табл. 2.2.55.-1.

3) Дана стаття була переглянута відповідно до фармакопейної гармонізації. Див. статтю 5.8. «Фармакопейна гармонізація»



## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

Цей список не є вичерпним і розширюватиметься у міру встановлення інших розщеплюючих речовин.

**Попередня обробка випробовуваного зразка.** Залежно від розміру або конфігурації білка можуть бути використані різні підходи до попередньої обробки зразка. При використанні трипсину як розщеплюючої речовини для білків з молекулярною масою більше 100 000 Да залишки лізину мають бути захищені цитраконізацією або малеюванням, інакше утворюється дуже багато пептидів.

**Попередня обробка розщеплюючої речовини.** Попередня обробка розщеплюючих речовин, особливо ферментних, з метою їх очищення може бути необхідна для гарантії відтворюваності пептидної карти. Наприклад, трипсин, використовуваний як розщеплююча речовина, має бути оброблений тозил-*L*-фенілаланінхлорометилкетонем для інактивації хімотрипсину. Також використовують інші методи, такі як очищення трипсину методами високоефективної рідинної хроматографії (HPLC; ВЕРХ) або іммобілізація ферменту на основі гелю, якщо в наявності є незначна кількість білка.

**Попередня обробка білка.** У певних умовах може бути необхідна концентрація зразка або відділення білка від доданих субстанцій і стабілізаторів, використовуваних у лікарській формі, якщо їх наявність чинить вплив на методику картування. Як фізичні методи, використовувані для попередньої обробки, можуть бути використані такі методи: ультрафільтрація, колонкова хроматографія і ліофілізація. Інші способи попередньої обробки, такі як додавання роз'єднуючого агента (наприклад, сечовини), можуть бути використані для розгортання білка перед картуванням. Для того, щоб дати змогу ферменту мати повний доступ до розщеплюваного сайту і ви-

кликати деяке розгортання білка, як правило, необхідно відновити і алкілувати дисульфідні зв'язки перед розщепленням.

Гідроліз із використанням трипсину може викликати невизначеності в пептидній карті, що є наслідком побічних реакцій, які відбуваються в процесі розщеплювання, таких як неспецифічне розщеплювання, деамідування, дисульфідна ізомеризація, окислення метіонінових залишків або утворення піроглутамінових груп, викликане деамідуванням глутаміну на *N*-кінцевій стороні пептиду. Крім того, піки можуть бути результатом аутогідролізу трипсину. Їх інтенсивність залежить від співвідношення трипсину і білка. Для того, щоб уникнути аутогідролізу, розчини протеолітичних ферментів можуть бути приготовані при значеннях рН, які не є оптимальними для них (наприклад, для трипсину рН 5), щоб фермент не став активним доти, поки він не буде розведений ферментним буфером.

**Встановлення оптимальних умов розщеплювання.** Фактори, які чинять вплив на повноту і ефективність розщеплювання білків, це ті фактори, які можуть чинити вплив на протікання будь-яких хімічних або ферментативних реакцій.

**рН реакційного середовища.** рН розщеплюючої суміші визначають емпірично для оптимізації ефективності даної розщеплюючої речовини. Наприклад, при використанні бромціану як розщеплюючої речовини необхідне середовище з високою кислотністю (наприклад, рН 2; мурашина кислота); проте при використанні трипсину як розщеплюючої речовини оптимальним є слаболужне середовище (рН 8). Як правило, значення рН реакційного середовища не має змінювати хімічну цілісність білка в процесі гідролізу і не має мінятися в процесі протікання реакції фрагментації.

Таблиця 2.2.55.-1

Приклади розщеплюючих агентів

Тип	Розщеплюючий агент	Специфічність
Ферментативний	Трипсин (Enzyme catalog (ЕС 3.4.21.4))	C-кінцева сторона Арг і Ліс
	Хімотрипсин (ЕС 3.4.21.1)	C-кінцева сторона гідрофобних залишків (наприклад, Лей, Мет, Ала, ароматичні амінокислоти)
	Пепсин (ЕС 3.4.23.1 і 2)	Неспецифічне розщеплювання
	Лізил-ендопептидаза (Ліз-С-ендопептидаза) (ЕС 3.4.21.50)	C-кінцева сторона Ліз
	Глутаміл-ендопептидаза (з <i>S. aureus</i> штам V8) (ЕС 3.4.21.19)	C-кінцева сторона Глю і Асп
	Пептидил-асп-метал-ендопептидаза (ендопротеаза Асп-N)	N-кінцева сторона Асп
Хімічний	Клострипаїн (ЕС 3.4.22.8)	C-кінцева сторона Арг
	Бромціан	C-кінцева сторона Мет
	2-Нітро-5-тіо-ціанбензойна кислота	N-кінцева сторона Цис
	<i>o</i> -Йодбензойна кислота	C-кінцева сторона Трп і Тир
	Розведена кислота	Асп і Про
	BNPS-скатол	Трп

**Температура.** Температура від 25 °С до 37 °С підходить для більшості процесів гідролізу. Використовувана температура планується з метою мінімізації протікання побічних хімічних реакцій. Тип випробовуваного білка визначає температуру реакційного середовища, оскільки деякі білки чутливіші до денатурації при підвищенні температури реакційного середовища. Наприклад, розщеплювання рекомбінантного бичачого соматропіну проводять при 4 °С, тому що при вищій температурі в процесі гідролізу відбувається його осадження.

**Час.** Якщо зразка достатня кількість, час протікання реакції визначається оптимальним часом, необхідним для одержання відтворної карти, уникнувши при цьому неповного гідролізу. Час гідролізу варіює від 2 год до 30 год. Реакцію зупиняють додаванням кислоти, що не впливає на результат картування, або заморожуванням.

**Кількість використаного розщеплюючого агента.** Хоча для досягнення достатньої швидкості розщеплювання (тобто від 6 год до 20 год) використовують надлишок розщеплюючого агента, його кількість прагнуть мінімізувати, щоб уникнути його впливу на хроматографічну схему пептидної карти. Зазвичай використовують співвідношення білка і протеази від 20:1 до 200:1. Для оптимізації розщеплювання рекомендується додавати розщеплюючий агент у 2 або більше стадій. Проте кінцевий об'єм реакційної суміші має залишитися достатньо невеликим, щоб полегшити наступний етап методики пептидного картування, етап розділення. Для усунення артефактів, які можуть вплинути на подальший аналіз, проводять холосте випробування, а саме розщеплювання з усіма використовуваними реагентами, за винятком випробовуваного білка.

## ХРОМАТОГРАФІЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ

Для розділення пептидів з метою картування використовують багато методів. Вибір методу залежить від випробовуваного білка. Методи, які успішно використовують для розділення пептидів, наведені в Табл. 2.2.55-2. У даному розділі як один з найширше використовуваних методів хроматографічного розділення наведений метод обернено-фазової ВЕРХ.

Чистота розчинників і рухомих фаз є критичним фактором при розділенні ВЕРХ. Для обернено-фазової хроматографії рекомендуються комерційно доступні розчинники кваліфікації «Для ВЕРХ» і вода кваліфікації «Для ВЕРХ». Присутність розчинених газів є проблемою в градієнтній системі, коли розчинність газу в розчиннику може бути меншою в суміші, ніж в окремому розчиннику. Часто для видалення газу використовують вакуумну дегазацію і обробку ультразвуком. Коли тверді частинки з розчинником потрапляють у ВЕРХ систему, вони можуть порушувати ущільнення клапана насоса або захарашувати верхню частину хроматографічної ко-

лонки. Рекомендується як до-, так і післянасосна фільтрація.

Таблиця 2.2.55-2

*Методи, використовувані для розділення пептидів*

Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія (ОФ ВЕРХ) Іонобмінна хроматографія (ІОХ) Хроматографія гідрофобної взаємодії (ХГВ) Електрофорез на поліакриламідному гелі (ЕПАГ), не денатуруючий Електрофорез на натрію додецилсульфатполіакриламідному гелі (НДС-ПАГЕ) Капілярний електрофорез (КЕ) Хроматографія на папері з використанням високої напруги (ПХВН) Електрофорез на папері з використанням високої напруги (ВНПЕ)
---

**Хроматографічна колонка.** Вибір хроматографічної колонки визначається емпірично для кожного конкретного білка. Оптимальне розділення можуть забезпечити колонки з силікагелевим носієм із розміром пір сорбенту від 10 нм до 30 нм. Для невеликих пептидів ефективніші колонки, заповнені силікагелем октилсилільним для хроматографії Р (розмір частинок від 3 мкм до 10 мкм) і силісилікагелем октадецилільним для хроматографії Р (розмір частинок від 3 мкм до 10 мкм), ніж з силікагелем бутілсилільним для хроматографії Р (розмір частинок від 5 мкм до 10 мкм).

**Розчинник.** Найбільш часто використовуваним розчинником є вода з ацетонітрилом як органічний модифікатор, до якого додано не більше 0.1 % трифторооцтової кислоти. Якщо необхідно, додають пропіловий спирт або ізопропіловий спирт для підвищення розчинності компонентів гідролізату, стежачи за тим, щоб збільшення модифікатора надмірно не збільшувало в'язкість компонентів.

**Рухома фаза.** Для забезпечення експлуатаційної гнучкості при виборі рН використовують буферизовані рухомі фази, що містять фосфати, оскільки зсув рН у діапазоні від 3.0 до 5.0 покращує розділення пептидів, які містять кислотні залишки (наприклад, глутамінової й аспарагінової кислот). Також використовують натрію або калію фосфат, амонію ацетат, фосфорну кислоту для створення рН від 2 до 7 (або вище для носіїв на полімерній основі) з ацетонітрилом для створення градієнта. Досить часто використовують ацетонітрил, що містить трифторооцтову кислоту.

**Градієнт.** Градієнт може бути лінійним, нелінійним або мати декілька етапів. Для того, щоб розділити складну суміш, рекомендується пологий градієнт. Градієнти оптимізують для забезпечення чіткого розрізнення 1 або 2 піків, які вибирають «маркерами» для даного випробування.

**Ізократичне елюювання.** Ізократичні ВЕРХ системи, в яких використовується одна рухома фаза, застосовують через зручність їх використання і кращі від-

## 2.2 Фізичні та фізико-хімічні методи

гук детектора. Іноді складно вибрати оптимальний склад рухомої фази для одержання чіткого розділення кожного піка. Рухомі фази, для яких невеликі зміни у співвідношеннях компонентів або в значенні рН значно впливають на час утримування піків у пептидній карті, не мають використовуватися в ізо-кратичних ВЕРХ системах.

**Інші параметри.** Для досягнення хорошої відтворюваності зазвичай необхідний контроль температури колонки. Швидкості потоків рухомих фаз знаходяться в діапазоні від 0.1 мл/хв до 2.0 мл/хв, детектування пептидів виконують з УФ-детектором за довжин хвиль від 200 нм до 230 нм. Використовують також інші методи детектування (наприклад, постколону дериватизацію), але вони не володіють такою стійкістю і експлуатаційною гнучкістю, як УФ-детектування.

**Валідація.** У даному розділі наводять експериментальні способи визначення загальних функціональних характеристик методики випробування. Критерії прийнятності придатності системи залежать від того, як будуть визначені критичні параметри випробування, які впливають на інтерпретацію даних і ухвалення рішення. Ці критичні параметри є критеріями контролю розщеплювання пептидів і аналізу пептидів. Підтвердження того, що кінцева точка розкладання досягнута, отримують шляхом порівняння зі стандартним зразком, з яким проводять ті самі операції, що і з випробовуваним білком. Використання стандартної речовини паралельно з випробовуваним білком є критичною умовою при розробці і затвердженні меж для придатності системи. Зразок хроматограми додатково прикладають до стандартного зразка для порівняння. Інші критерії придатності можуть включати візуальну перевірку розчинності білка або пептиду, відсутність вихідних білків або вимірювання відгуків, відповідних утвореним в результаті розщеплювання пептидам. Критичні параметри хроматографічної системи для аналізу пептидів залежать від режиму розділення пептидів і детектування і від вимог до результатів аналізу.

Якщо пептидне картування використовують як ідентифікаційне випробування, вимогою придатності системи для пептидів, що ідентифікуються, є вибірковість і прецизійність. У таких випадках, якщо також проведена ідентифікація варіантного білка, ідентифікація первинної структури пептидних фрагментів означає також підтвердження відомої первинної структури і ідентифікацію варіанта білка шляхом порівняння з пептидною картою стандартного зразка даного білка. При визначенні коефіцієнта розділення пептидів можливе використання розщепленого стандартного зразка даного білка. Для аналізу варіантних білків може бути використана охарактеризована суміш варіантного білка і стандартного зразка, особливо, якщо відгук для варіантного пептиду локалізований в області

пептидної карти з меншим розділенням. Показником ступеня схожості може бути просто число основних пептидів, які детектуються. Відповідність виду хроматограми щонайкраще може бути охарактеризована зазначенням параметрів ступеню розділення піків пептидів. Для визначення ступеня розділення пептидів можуть бути використані хроматографічні параметри, такі як коефіцієнт розділення піків пептидів, ширина максимального піка, площа піка, коефіцієнт симетрії піка, ефективність колонки. Залежно від випробовуваного білка і використовованого методу розділення можуть бути необхідними вимоги до розділення для одного пептиду або декількох пептидів.

За наслідками повторних випробувань розщепленого стандартного зразка випробовуваного білка визначають прецизійність і кількісне співвідношення «знайдено/уведено». Відношення «знайдено/уведено» для визначуваних пептидів зазвичай встановлюють за допомогою «внутрішніх» або «зовнішніх» стандартів пептидів. Прецизійність виражають як відносне стандартне відхилення (*RSD*). Можливі варіювання як у співвідношеннях «знайдено/уведено», так і в прецизійності для пептидів, що ідентифікуються; тому для обох критеріїв: відношення «знайдено/уведено» і прецизійності для пептидів, що ідентифікуються, мають бути затверджені межі придатності системи. Ці межі індивідуальні для кожного білка і мають бути специфіковані в конкретній окремій статті.

Спочатку проводиться візуальне порівняння значень відносного утримування, відгуків аналітичного сигналу для піка (площа піка або висота піка), число піків, загальна послідовність елювання. Результати потім доповнюються і обґрунтовуються математичним аналізом відношень відгуків піка і хроматографічним профілем суміші випробовуваного зразка і розщепленого стандартного зразка у співвідношенні 1:1 (*об/об*). Якщо всі піки для продуктів розщеплювання випробовуваного зразка і стандартного зразка мають однакові значення відносного утримування і відношення відгуків піків, то ідентичність для випробовуваного зразка в умовах методики підтверджена.

Якщо піки, які елюють спочатку із значущими відмінностями відносних часів утримування, потім рееструються як одиничні піки в суміші 1:1, то на підставі такої початкової відмінності можна зробити припущення про нестійкість системи. Проте, якщо спостерігаються інші незалежні піки в суміші 1:1, це буде доказом нееквівалентності пептидів для кожного піка. Якщо пік у суміші 1:1 значущо ширший відповідного піка в розщепленому випробовуваному зразку і розщепленому стандартному зразку, це може свідчити про наявність різних пептидів. Рекомендується і застосовується комп'ютерне забезпечення розпізнавання даних методом пептидного картування, але те, що результати випробувань залежать від валідації комп'ютерного забезпечення, перешкоджає його використанню у фармакопейних

випробуваннях у найближчому майбутньому. Використовуються також інші автоматизовані методи, в яких застосовуються математичні формули, моделі і розпізнавання образів. Використовують, наприклад, автоматизовані системи ідентифікації сполучень методом ІК-спектроскопії і застосування діодно-матричного аналізу УФ-спектрального аналізу для ідентифікації пептидів. Ці методи обмежені недостатнім ступенем розділення, коелюванням фрагментів або відмінностями абсолютних значень відклику між стандартним зразком і фрагментами розщепленого випробовуваного зразка.

Може бути проведене цифрове зіставлення часів утримування піків і площ піків або висот піків для вибраних груп відповідних піків, які коректно ідентифіковані на пептидній карті. Площі піків можуть бути розраховані з використанням 1 піка, що показує відносно невелике варіювання як внутрішній стандарт, зважаючи, що зміна базової лінії може впливати на результати інтегрування площі піка і може вносити помилку в аналіз. Як альтернатива для випробовуваного зразка може бути розрахований відсоток висоти піка кожного пептиду щодо суми висот усіх піків. Набуте значення порівнюють зі значенням, розрахованим для відповідного піка стандартного зразка. Можливість аутогідролізу трипсину контролюють отриманням пептидної карти холостого зразка, а саме, отримують пептидну карту холостого розчину, обробленого трипсином.

Мінімальною вимогою для кваліфікації методики пептидного картування є прийнята процедура випробування, що включає перевірку придатності системи. Зазвичай на перших стадіях затвердження в регуляторних органах досить показати кваліфікацію методики пептидного картування для білка. Надалі додаткові кваліфікаційні випробування можуть бути включені у валідацію аналітичної методики для доказу того, що методика забезпечує для конкретного білка, що специфікується, такі самі за якістю результати, що і при розробці методики.

## АНАЛІЗ І ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПЕПТИДІВ

*У даному розділі наведені вказівки щодо використання пептидного картування в процесі розробки нормативної документації для надання інформації в регуляторні органи.*

Використання пептидного картування як якісного інструментального методу не вимагає повної характеристики індивідуальних пептидних піків. Проте

валідація методу пептидного картування для розробки нормативної документації, що надається в регуляторні органи, вимагає визначення точних характеристик кожного індивідуального піка в пептидній карті. Діапазон методів характеристики піків: від *N*-кінцевого секвенування кожного піка і подальшого амінокислотного аналізу до використання мас-спектроскопії (MS).

При використанні *N*-кінцевого секвенування і амінокислотного аналізу з метою складання специфікації проводять масштабування аналітичного розділення. Масштабування може призводити до погіршення розділення піків білків, у зв'язку з цим необхідно, використовуючи емпіричні дані, гарантувати відсутність погіршення розділення в процесі масштабування. Елюати, відповідні індивідуальним пікам білків, збирають, концентрують під вакуумом і, якщо необхідно, знов хроматографують. Амінокислотний аналіз фрагментів може бути обмежений розмірами пептидів. Якщо *N*-кінцева сторона заблокована, може бути необхідним усунути блокування до секвенування. Для зняття характеристик також можуть бути використані *C*-кінцеве секвенування білків у комбінації з карбоксипептидазою і матрично-прискореною лазерною десорбційною іонізацією з часо-пролітним аналізатором (MALDI-TOF).

Для одержання характеристик пептидних фрагментів використовують мас-спектроскопію або шляхом прямого введення виділених пептидів, або з використанням комбінації LS-MS для структурного аналізу «on-line». Зазвичай використовують електроіонізацію і MALDI-TOF-MS, а так само метод бомбардування швидкими атомами (FAB). Також використовується тандемна мас-спектроскопія для встановлення послідовності в модифікованому білку і для визначення типу амінокислотної модифікації, що відбулася. Порівняння мас-спектрів продуктів розщеплювання білка до і після відновлення дає можливість встановити положення дисульфідних зв'язків у різних сульфідрил-включаючих пептидах.

Якщо області первинної структури точно не підтверджуються за допомогою пептидної карти, може бути необхідним отримати вторинну пептидну карту. Метою валідованого методу характеристики білків за допомогою пептидного картування є розпізнавання як мінімум 95 % від теоретичного складу білкової структури.

## 2.4 Випробування на граничний вміст домішок

### 2.4. ВИПРОБУВАННЯ НА ГРАНИЧНИЙ ВМІСТ ДОМІШОК

#### 2.4.8. ВАЖКІ МЕТАЛИ

У методах, описаних нижче, необхідне використання *тіоацетамідного реактиву Р*. Як альтернатива звичайно підходить *розчин натрію сульфідру Р1* (0,1 мл). Оскільки випробування, описані в монографіях, були розроблені з використанням *тіоацетамідного реактиву Р*, то, якщо замість нього використовується *розчин натрію сульфідру Р*, необхідно включити також для методів А, В і Н контрольний розчин, приготований з кількості випробовуваної субстанції, зазначеної для даного випробування, до якої доданий об'єм стандартного розчину свинцю, зазначений для приготування розчину порівняння. Випробування вважають недійсним, якщо забарвлення контрольного розчину менш інтенсивне за забарвлення розчину порівняння.

#### МЕТОДА

*Випробовуваний розчин*. 12 мл зазначеного водного розчину випробовуваної субстанції.

*Розчин порівняння (еталон)*. Змішують 10 мл *еталонного розчину свинцю (1 ррт) Р* або *еталонного розчину свинцю (2 ррт) Р*, зазначеного в окремій статті, і 2 мл зазначеного водного розчину випробовуваної субстанції.

*Холостий розчин*. Змішують 10 мл *води Р* і 2 мл зазначеного водного розчину випробовуваної субстанції.

До кожного розчину додають 2 мл *буферного розчину (рН 3.5) Р*. Перемішують і додають 1,2 мл *тіоацетамідного реактиву Р*, негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують.

*Придатність системи*: розчин порівняння повинен мати світло-коричнє забарвлення при порівнянні з холостим розчином.

*Результат*: коричнє забарвлення випробовуваного розчину має бути не більш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння.

Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0,45 мкм). Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

#### МЕТОД В

*Випробовуваний розчин*. 12 мл випробовуваного розчину випробовуваної субстанції готують з ви-

користанням органічного розчинника, що містить мінімальну кількість води (наприклад, діоксан, що містить 15 % води, або ацетон, що містить 15 % води).

*Розчин порівняння (еталон)*. Змішують 10 мл *еталонного розчину свинцю (1 ррт або 2 ррт Рb)*, як зазначено в окремій статті, і 2 мл зазначеного розчину випробовуваної субстанції в органічному розчиннику. Готують *еталонний розчин свинцю (1 ррт або 2 ррт Рb)* шляхом розведення *еталонного розчину свинцю (100 ррт Рb) Р* розчинником, використовуваним для розчинення випробовуваної субстанції.

*Холостий розчин*. Змішують 10 мл розчинника, використовуваного для розчинення випробовуваної субстанції, і 2 мл зазначеного розчину випробовуваної субстанції в органічному розчиннику.

До кожного розчину додають 2 мл *буферного розчину (рН 3.5) Р*. Перемішують і одержаний розчин додають до 1,2 мл *тіоацетамідного реактиву Р*, негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують.

*Придатність системи*: розчин порівняння повинен мати світло-коричнє забарвлення при порівнянні з холостим розчином.

*Результат*: коричнє забарвлення випробовуваного розчину має бути не більш інтенсивне за забарвлення розчину порівняння.

Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (розмір пір 0,45 мкм). Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

#### МЕТОД С

*Випробовуваний розчин*. Зазначену кількість (але не більше 2 г) випробовуваної субстанції поміщають у кварцовий тигель з 4 мл розчину 250 г/л *магнію сульфату Р* у *кислоті сірчаній розведеній Р*, перемішують тонкою скляною паличкою і обережно нагрівають. Якщо суміш рідка, обережно випаровують на водяній бані до сухого залишку, потім поступово нагрівають до обуглювання і продовжують нагрівання до отримання майже білого або в крайньому разі сіруватого залишку. Спалювання проводять при температурі не більше 800 °С. Залишають до охолодження, потім залишок у тиглі змочують декількома краплями *кислоти сірчаної розведеної Р*. Випарюють до сухого залишку, знов спалюють і залишають до охолодження. Загальний час спалювання не має перевищувати 2 год. Залишок з тигля кількісно переносять у пробірку двома порціями *кислоти хлористоводневої розведеної Р*, по 5 мл кожна. Додають 0,1 мл *розчину фенолфталеїну Р*, потім підтужують *розчином аміаку концентрованим Р* до появи рожевого забарвлення. Охолоджують, додають *кислоту ситову льодяну Р* до

знебарвлення розчину і додають ще 0.5 мл кислоти оцтової льодяної Р. Якщо необхідно, фільтрують і промивають фільтр водою Р. Доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

*Розчин порівняння (еталон).* Готують еталон таким самим чином, як і випробовуваний розчин, використовуючи зазначений об'єм еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р замість випробовуваної субстанції. До 10 мл одержаного розчину додають 2 мл випробовуваного розчину.

*Контрольний розчин.* Готують так само чином, як і випробовуваний розчин, додаючи до випробовуваної субстанції об'єм еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р, зазначений для приготування розчину порівняння. До 10 мл одержаного розчину додають 2 мл випробовуваного розчину.

*Холостий розчин.* Змішують 10 мл води Р і 2 мл випробовуваного розчину.

До 12 мл кожного розчину додають 2 мл буферного розчину (рН 3.5) Р і перемішують. Одержаний розчин додають до 1.2 мл тіоацетамідного реактиву Р і негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують.

#### *Придатність системи:*

- розчин порівняння повинен мати коричневе забарвлення при порівнянні з холостим розчином;
- забарвлення контрольного розчину має бути не менш інтенсивним, за забарвлення розчину порівняння.

*Результат:* коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не більш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння.

## МЕТОД D

*Випробовуваний розчин.* У кварцовому тиглі ретельно змішують зазначену кількість випробовуваної субстанції з 0.5 г магнею оксиду Р1. Спалюють при слабкому червоному жарі до утворення однорідного залишку білого або сірувато-білого кольору. Якщо після 30 хв спалювання суміш залишається забарвленою, тигель залишають до охолодження, вміст перемішують тонкою скляною паличкою і повторюють спалювання. Якщо необхідно, операцію повторюють. Нагрівають при температурі 800 °С близько 1 год. Залишок з тигля кількісно переносять у пробірку 2 порціями по 5 мл суміші однакових об'ємів розчину кислоти хлористоводневої Р1 і води Р. Додають 0.1 мл розчину фенолфталеїну Р, потім підлюжують розчином аміаку концентрованим Р до появи рожевого забарвлення. Охолоджують, підкисляють кислотою оцтовою льодяною Р до знебарвлення розчину і додають ще 0.5 мл кислоти оцтової льодяної Р. Якщо необхідно, фільтрують і промивають фільтр водою Р. Доводять об'єм розчину водою Р до 20 мл.

*Розчин порівняння (еталон).* Готують еталон таким самим чином, як і випробовуваний розчин, використовуючи зазначений в окремій статті об'єм

еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р замість випробовуваної субстанції, і висушують у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С. До 10 мл одержаного розчину додають 2 мл випробовуваного розчину.

*Контрольний розчин.* Готують таким самим чином, як і випробовуваний розчин, додаючи до випробовуваної субстанції об'єм еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р, зазначений при приготуванні розчину порівняння, і висушують у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С. До 10 мл одержаного розчину додають 2 мл випробовуваного розчину.

*Холостий розчин.* Змішують 10 мл води Р і 2 мл випробовуваного розчину.

До 12 мл кожного розчину додають по 2 мл буферного розчину (рН 3.5) Р. Перемішують і одержаний розчин додають до 1.2 мл тіоацетамідного реактиву Р. Негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують.

#### *Придатність системи:*

- розчин порівняння повинен мати світло-коричневе забарвлення при порівнянні з холостим розчином;
- забарвлення контрольного розчину має бути не менш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння.

*Результат:* коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивніше за забарвлення розчину порівняння.

Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0.45 мкм; див. Рис. 2.4.8.-1, без передфільтра. Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

## МЕТОД E

*Випробовуваний розчин.* Зазначену в окремій статті кількість випробовуваної субстанції розчиняють в 30 мл води Рабо використовують зазначений в окремій статті об'єм випробовуваної речовини.

*Розчин порівняння (еталон).* Якщо немає інших зазначень в окремій статті, розводять зазначений в окремій статті об'єм еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) Р до такого самого об'єму, що і випробовуваний розчин.

Готують пристрій для фільтрування шляхом встановлювання корпусу шприца місткістю 50 мл без поршня у тримач, що включає мембранний фільтр (номінальний розмір пір 3 мкм) на підкладці, а вище за нього - передфільтр (див. Рис. 2.4.8.-1).

Переносять випробовуваний розчин у корпус шприца, вводять поршень і потім прикладають рівномірний тиск на поршень, поки вся рідина не профільтрується. Знявши тримач, видаляють передфільтр так, щоб мембранний фільтр не забруднився доміш-

## 2.4 Випробування на граничний вміст домішок

ками. У супротивному разі його замінюють іншим мембранним фільтром і повторюють операцію в тих самих умовах.

До одержаного фільтрату або до зазначеного в окремій статті об'єму фільтрату додають 2 мл *буферного розчину (рН 3,5) Р*. Перемішують і одержану суміш додають до 1.2 мл *тіоацетамідного реактиву Р*. негайно перемішують, залишають на 10 хв і знову фільтрують як зазначено вище, але при цьому змінюючи порядок розташування фільтрів: рідину пропускають спочатку крізь мембранний фільтр, а потім крізь передфільтр (Рис. 2.4.8.-1). Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Після закінчення фільтрації знімають тримач, мембранний фільтр виймають і висушують за допомогою фільтрувального паперу.

Паралельно проводять ті самі операції з розчином порівняння.

**Результат:** Забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержане у випробуванні з випробовуваним розчином, має бути не більш інтенсивним за забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержаного у випробуванні з розчином порівняння.

### МЕТОД F

**Випробовуваний розчин.** Кількість або об'єм випробовуваної субстанції, зазначені в окремій статті, поміщають у чисту, суху колбу К'ельдаля місткістю 100 мл (у разі інтенсивного піноутворення слід використовувати колбу місткістю 300 мл). Колбу закріплюють під кутом 45°. Якщо випробовувана субстанція є твердою речовиною, додають достатній об'єм суміші 8 мл *кислоти сірчаної Р1* і 10 мл *кислоти*

*азотної Р*, щоб ретельно змочити випробовувану субстанцію; якщо випробовувана субстанція є рідиною, додають декілька мілілітрів суміші 8 мл *кислоти сірчаної Р1* і 10 мл *кислоти азотної Р*. Обережно нагрівають до початку реакції, після припинення реакції додатково додають ту саму суміш кислот порціями, нагріваючи після додавання кожної порції, поки загальний об'єм доданої суміші кислот не досягне 18 мл. Збільшують ступінь нагріву і кип'ятять з обережністю до потемніння розчину. Охолоджують, додають 2 мл *кислоти азотної Р* і нагрівають знову до потемніння розчину. Продовжують нагрівання, послідовно порціями додаючи *кислоту азотну Р*, поки розчин не перестане темніти, потім сильно нагрівають до появи щільної білої пари. Охолоджують, обережно додають 5 мл *води Р*, кип'ятять з обережністю до появи щільної білої пари і продовжують нагрівання до одержання залишку об'ємом від 2 мл до 3 мл. Охолоджують, обережно додають 5 мл *води Р* і визначають забарвлення розчину. Якщо розчин має жовте забарвлення, додають краплями 1 мл *розчину водню пероксиду концентрованого Р1* і знов нагрівають до появи щільної білої пари і продовжують нагрівання до одержання залишку об'ємом від 2 мл до 3 мл. Якщо забарвлення розчину все ще залишається жовтим, повторюють додавання 5 мл *води Р* і 1 мл *розчину водню пероксиду концентрованого Р* до знебарвлення розчину. Охолоджують, обережно розводять розчин *воддю Р* і, обполіскуючи колбу, переносять її вміст у пробірку для порівняльних випробувань місткістю 50 мл так, щоб загальний об'єм не перевищив 25 мл. Установлюють рН розчину до значення 3.0-4.0 *розчином аміаку концентрованим Р1*, використовуючи як зовнішній індикатор індикаторний папір, що діє у вузькому інтервалі рН (при наближенні до специфікованого діапазону рН можливе використання *розчину аміаку розведеного*

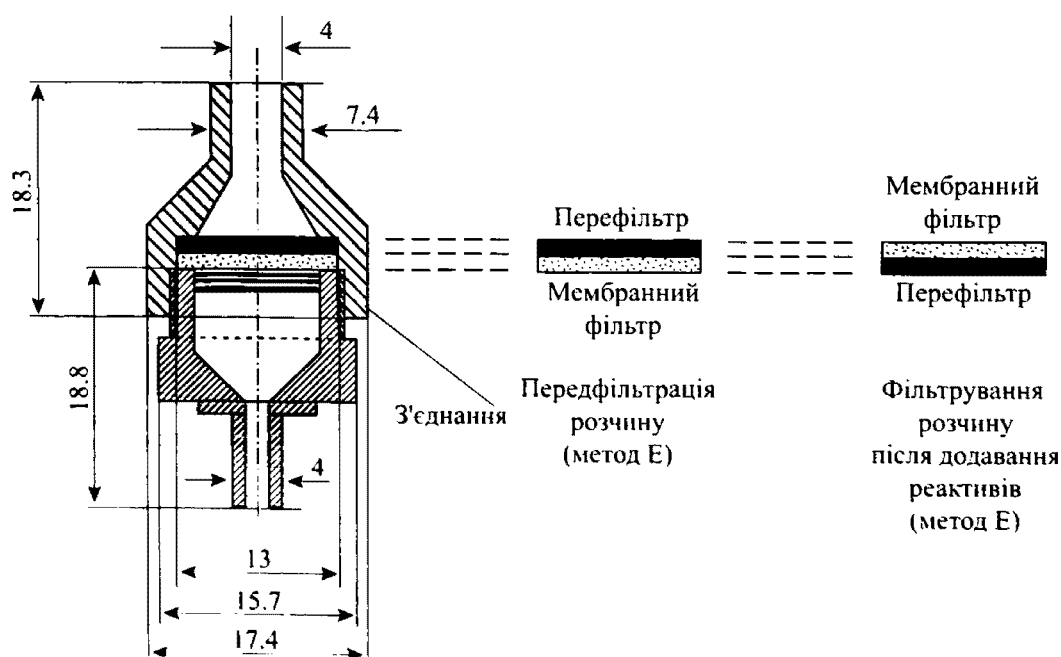


Рис. 2.4.8.-1. Прилад для випробування на солі важких металів  
Розміри зазначені в міліметрах

*P1*), потім доводять об'єм розчину до 40 мл і перемішують. Додають 2 мл *буферного розчину рН* (*рН 3.5*) *P*. Перемішують і одержану суміш додають до 1,2 мл *тіоацетамідного реактиву P*. Негайно перемішують. Доводять об'єм розчину *водою P* до 50 мл і перемішують.

*Розчин порівняння (еталон)*. Паралельно готують еталон, таким самим чином, як і випробовуваний розчин, використовуючи зазначений в окремій статті об'єм *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P*.

*Контрольний розчин*. Готують таким самим чином, як і випробовуваний розчин, додаючи до випробовуваної субстанції об'єм *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P*, зазначений для приготування розчину порівняння.

*Холостий розчин*. Готують, як зазначено для випробовуваного розчину, але без додавання випробовуваної субстанції.

Через 2 хв проводять порівняння забарвлення розчинів, переглядаючи вздовж вертикальної осі пробірок на білому фоні.

#### *Придатність системи:*

- розчин порівняння повинен мати коричневе забарвлення при порівнянні з холостим розчином;
- забарвлення контрольного розчину має бути не менш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння.

*Результат:* коричневе забарвлення випробовуваного розчину не має бути більш інтенсивне за забарвлення розчину порівняння.

Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (розмір пір 0,45 мкм. Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

## МЕТОД G

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ.** При використанні реакційних колб в умовах високого тиску мають бути в наявності правила техніки безпеки й інструкції щодо застосування, надані виробником обладнання. Операційні цикли розкладу мають бути ретельно розроблені для використовуваного типу мікрохвильових печей (наприклад, мікрохвильові печі з контрольованою енергією, мікрохвильові печі з контрольованою температурою або печі високого тиску). Операційний цикл має бути узгоджений з інструкціями виробника. Цикл розщеплення є додатним при отриманні прозорого розчину.

*Випробовуваний розчин*. Поміщають зазначену в окремій статті кількість субстанції (не більше 0,5 г) у підложу чисту хімічну склянку. Використовуючи магнітну мішалку, додають послідовно 2,7 мл *кис-*

*лоти сірчаної P*, 3,3 мл *кислоти азотної P* і 2,0 мл *розчину водню пероксиду концентрованого P*. Дають субстанції можливість прореагувати з реактивом до додавання наступного реактиву. Переносять суміш у суху реакційну колбу, виготовлену з фторополімеру або кварцового скла, стійку до дії високого тиску.

*Розчин порівняння (еталон)*. Готують еталон таким самим чином, як і випробовуваний розчин, використовуючи зазначений об'єм *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P* замість випробовуваної субстанції.

*Контрольний розчин*. Готують таким самим чином, як і випробовуваний розчин, додаючи до випробовуваної субстанції об'єм *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P*, зазначений для приготування розчину порівняння.

*Холостий розчин*. Готують, як зазначено для випробовуваного розчину, але без додавання випробовуваної субстанції.

Закривають колби і поміщають у лабораторну мікрохвильову піч. Проводять розклад, використовуючи послідовно 2 окремі підхожі програми. Планують програми у декілька ступенів для контролю реакції, моніторингу тиску, температури або енергії, залежних від типу використовуваної мікрохвильової печі. Після першої програми залишають реакційні колби охолоджуватися перед тим, як їх відкрити. Додають у кожен колбу 2,0 мл *розчину водню пероксиду концентрованого P* і проводять розклад, використовуючи другу програму. Після другої програми залишають реакційні колби охолоджуватися перед тим, як їх відкрити. Якщо необхідно одержати прозорий розчин, здійснюють повторення додавання *розчину водню пероксиду концентрованого P* і другої програми розкладу.

Охолоджують, обережно розводять *водою P* і переносять в іншу колбу, обполіскуючи реакційну колбу *водою P*, стежачи за тим, щоб загальний об'єм розчину не перевищив 25 мл.

Використовуючи індикаторний папір із вузьким інтервалом рН як внутрішній індикатор, доводять рН розчинів до значення 3,0–4,0 *розчином аміаку концентрованого P1* (при наближенні до специфікованого діапазону рН можливе використання *розчину аміаку розведеного P1*). Для того, щоб уникнути нагрівання розчинів, використовують льодяну баню і магнітну мішалку. Об'єм розчину доводять до 40 мл *водою P* і перемішують. Додають 2 мл *буферного розчину рН* (*рН 3.5*) *P*. Перемішують і одержану суміш додають до 1,2 мл *тіоацетамідного реактиву P*. Негайно перемішують. Доводять об'єм розчину *водою P* до 50 мл, перемішують і залишають на 2 хв.

Розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0,45 мкм. Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.



## 2.4 Випробування на граничний вміст домішок

### Придатність системи:

- пляма на фільтрі, одержана для розчину порівняння, повинна мати коричневе забарвлення при порівнянні з плямою, одержаною для холостого розчину;
- забарвлення плями на фільтрі, одержаної для контрольного розчину, має бути не менш інтенсивним, за забарвлення плями для розчину порівняння.

**Результат:** коричневе забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержане у випробуванні з випробовуваним розчином, не має бути більш інтенсивним за забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержане у випробуванні з розчином порівняння.

## МЕТОД Н

**Випробовуваний розчин.** Зазначену в окремій статті кількість випробовуваної субстанції розчиняють в 20 мл зазначеного розчинника або зазначеної суміші розчинників.

**Розчин порівняння.** Зазначений об'єм еталонного розчину свинцю (*10 ppm Pb*) *P* розводять до об'єму 20 мл зазначеним розчинником або зазначеною сумішшю розчинників.

**Холостий розчин.** 20 мл зазначеного розчинника або зазначеної суміші розчинників.

До кожного розчину додають 2 мл *буферного розчину з рН 3.5 P*. Перемішують. (У деяких випадках відбувається випадання осаду, в такому разі в окремій статті описується повторне розчинення в зазначеному об'ємі даного розчинника). Додають до 1.2 мл *тіоацетамідного реактиву P*. Немедленно перемішують і залишають на 2 хв. Розчини фільтрують крізь підходящий мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0.45 мкм). Проводять порівняння плям на фільтрах, одержаних для різних розчинів.

**Придатність системи:** пляма на фільтрі, одержана для розчину порівняння, повинна мати коричнево-чорне забарвлення при порівнянні з плямою, одержаною для холостого розчину.

**Результат:** коричнево-чорне забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержане у випробуванні з випробовуваним розчином, не має бути більш інтенсивним за забарвлення плями на мембранному фільтрі, одержане у випробуванні з розчином порівняння.

### 2.4.14. СУЛЬФАТНА ЗОЛА<sup>(1)</sup>

Підходящий тигель (наприклад, кремнієвий, платиновий, фарфоровий або кварцовий) прожарюють при температурі  $(600 \pm 50)$  °С протягом 30 хв, залишають до охолодження в ексикаторі над силікагелем або іншою підходящою висушуючою речовиною і зважують. Зазначену кількість випробовуваної речовини поміщають у тигель і зважують. Речовину змочують невеликою кількістю *кислоти сірчаної P* (звичайно 1 мл) і обережно нагрівають при можливо більш низькій температурі до повного обвуглювання зразка. Після охолодження залишок змочують невеликою кількістю *кислоти сірчаної P* (звичайно 1 мл), обережно нагрівають до появи білої пари і після її нетривалого виділення залишок прожарюють при температурі  $(600 \pm 50)$  °С до його повного обвуглювання. Стежать за тим, щоб під час прожарвання не виникало полум'я. Тигель залишають охолоджуватися в ексикаторі над силікагелем або іншою підходящою висушуючою речовиною, знову його зважують і розраховують процентний вміст залишку.

Якщо кількість залишку, одержаного таким чином, перевищує зазначену межу вмісту, залишок повторно змочують *кислотою сірчаною P* і повторно прожарюють протягом 30 хв таким самим чином, поки 2 послідовних зважування не відрізнятимуться більш як на 0.5 мг або поки процентний вміст залишку відповідатиме зазначеній межі вмісту.

Кількість субстанції, що використовується у випробуванні (звичайно від 1 г до 2 г), вибирають так, щоб зазначену межу маси залишку (звичайно близько 1 мг) можна було визначити з достатньою правильною.

<sup>1)</sup> Дана стаття була переглянута відповідно до фармакопейної гармонізації. Див. статтю 5.8. «Фармакопейна гармонізація»

## 2.5. МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

### 2.5.24. ДІОКСИД ВУГЛЕЦЮ В ГАЗАХ

Гази легко поглинають за одної або більше специфічних довжинах хвиль. Цю властивість широко використовують для високовибіркового визначення їх концентрацій.

**Опис і принцип вимірювання.** Концентрацію закису азоту вуглецю в інших газах можна визначити з використанням інфрачервоного аналізатора.

Інфрачервоний аналізатор звичайно містить джерело випромінювання, що генерує інфрачервоне випромінювання в широкому діапазоні, оптичний пристрій, комірку для зразка та детектор. Оптичний пристрій може бути розташований перед або за коміркою для зразка і містить один або декілька оптичних фільтрів, через які проходить широкосмугове випромінювання. Оптичний пристрій у цьому разі вибірковий для діоксиду вуглецю. Світловий промінь, який підлягає вимірюванню, проходить через комірку для зразка і може також проходити через комірку порівняння, якщо аналізатор влаштований таким чином (деякі використовувані електронні системи використовуються замість комірки порівняння).

Якщо в комірці для зразка знаходиться діоксид вуглецю, відбуватиметься поглинання енергії вимірюваного світлового променя відповідно до закону Ламберта-Бера і це викликати зміни в сигналі детектора. Даний сигнал, що детектується, порівнюється із сигналом, одержаним для комірки порівняння для одержання даних для розрахунку концентрації діоксиду вуглецю. Сигнал, що генерується, піддається лінеаризації для того, щоб одержати в підсумку значення концентрації діоксиду вуглецю. Для попередження попадання частинок у сенсор, які можуть стати причиною явища розсіяння світла, прилад забезпечений підходящим фільтром.

**Вимоги технічних специфікацій.** При використанні для граничного випробування інфрачервоний аналізатор має задовольняти такі вимоги:

**Межа детектування:** (звичайно визначається при відношення сигнал/шум, що дорівнює 2) не більше 20 % максимально допустимої концентрації;

**Відтворюваність:** RSD не більше 10 % від максимально допустимої концентрації, визначене з 6 вимірювань;

**Лінійність:** не більше 10 % від максимально допустимої концентрації, визначена з 6 вимірювань;

Вимоги мають виконуватися у присутності домішок іншого газу в зразку.

### 2.5.25. ОКСИД ВУГЛЕЦЮ В ГАЗАХ

#### МЕТОД І

**Прилад.** Прилад (Рис. 2.5.25.-1) складається з таких послідовно сполучених частин.

- U-подібна трубка ( $U_1$ ), що містить безводний силікагель  $P$ , просочений триоксидом хрому  $P$ ;
- промивна ємність ( $F_1$ ), що містить 100 мл розчину 400 г/л калію гідроксиду  $P$ ;
- U-подібна трубка ( $U_2$ ), що містить гранули калію гідроксиду  $P$ ;
- U-подібна трубка ( $U_3$ ), що містить фосфору ( $V$ ) оксид  $P$ , диспергований на поверхні заздалегідь гранульованої плавленої пемзи;
- U-подібна трубка ( $U_4$ ), що містить 30 г гранульованого йоду ( $V$ ) оксиду перекристалізованого  $P$ , заздалегідь висушеного при температурі 200 °C і підтримуваного в ході проведення випробування при температурі 120 °C ( $T$ ). П'ятиокис йоду розташовують у трубці стовпчиками заввишки 1 см, розділеними стовпчиками скловати заввишки 1 см, так, щоб ефективна довжина складала 5 см;
- реакційна пробірка ( $F_2$ ), що містить 2.0 мл розчину калію йодиду  $P$  і 0.15 мл розчину крохмалю  $P$ .

**Методика.** Прилад промивають 5.0 л аргону  $P$ , якщо необхідно, знебарвлюють розчин йодиду, додаючи

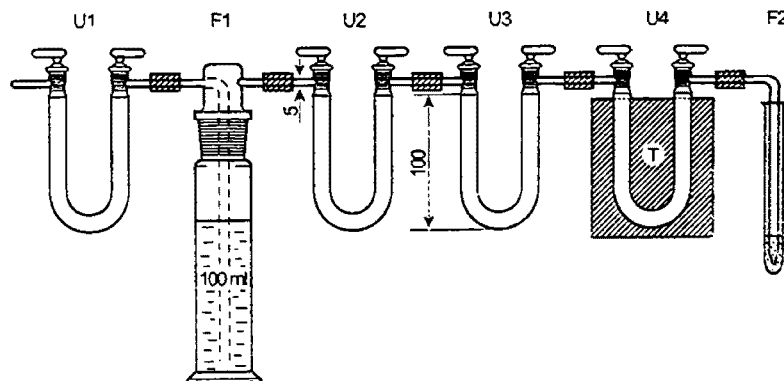


Рисунок 2.5.25.-1. Прилад для визначення оксиду вуглецю в медичних газах  
Розміри наведені в міліметрах

## 2.5 МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

мінімально необхідну кількість свіжоприготованого 0.002 М розчину тіосульфату натрію. Цю операцію продовжують доти, поки після пропускання через прилад чергових 5.0 л аргону Р на знебарвлення буде потрібно не більше 0.045 мл 0.002 М розчину натрію тіосульфату. Зазначену кількість випробовуваного газу пропускають із циліндра через прилад із зазначеною швидкістю. Для вимивання залишків йоду, що виділився, з приладу в реакційну пробірку, через прилад пропускають 1.0 л аргону Р. Йод, що виділився, титрують 0.002 М розчином натрію тіосульфату. Проводять холостий дослід з використанням зазначеної кількості аргону Р. Різниця об'ємів 0.002 М розчину натрію тіосульфату, що пішли на титрування, не має перевищувати зазначеної межі.

### МЕТОД І І

Гази легко поглинають за одної або більше специфічних довжинах хвиль. Цю властивість широко використовують для високовибіркового визначення їх концентрацій.

**Опис і принцип вимірювання.** Концентрацію оксиду вуглецю (чадний газ) в інших газах можна визначити з використанням інфрачервоного аналізатора.

Інфрачервоний аналізатор звичайно містить джерело випромінювання, що генерує інфрачервоне випромінювання в широкому діапазоні, оптичний пристрій, комірку для зразка та детектор. Оптичний пристрій може бути розташований перед або за коміркою для зразка і містить один або декілька оптичних фільтрів, через які проходить широкосмугове випромінювання. Оптичний пристрій у цьому разі вибірковий для вуглецю діоксиду. Світловий промінь, який підлягає вимірюванню, проходить через комірку для зразка і може також проходити через комірку порівняння, якщо аналізатор влаштований таким чином (деякі використовувані електронні системи використовуються замість комірки порівняння).

Якщо в комірці для зразка знаходиться оксид вуглецю, відбуватиметься поглинання енергії вимірюваного світлового променя відповідно до закону Ламберта-Бера і це викликатиме зміни в сигналі детектора. Даний сигнал, що детектується, порівнюється з сигналом, одержаним для комірки порівняння для одержання даних для розрахунку концентрації вуглецю оксиду. Сигнал, що генерується, піддається лінеаризації, для того, щоб одержати у підсумку значення концентрації діоксиду вуглецю. Для попередження попадання частинок в сенсор, які можуть стати причиною явища розсіяння світла, прилад забезпечений підходящим фільтром.

**Вимоги до технічних специфікацій.** При використанні для граничного випробування інфрачервоний аналізатор має задовольняти такі технічні специфікації:

**Межа детектування:** (звичайно визначають при відношенні сигнал/шум, що дорівнює 2) не більше 20 % максимально допустимої концентрації;

**Відтворюваність:** RSD не більше 10 % від максимально допустимої концентрації, визначене з 6 вимірювань;

**Лінійність:** не більше 10 % від максимально допустимої концентрації, визначена з 6 вимірювань;

Вимоги технічних специфікацій мають виконуватися у присутності домішок іншого газу в зразку.

### 2.5.31. РИБОЗА В ПОЛІСАХАРИДНИХ ВАКЦИНАХ

**Випробовуваний розчин.** Для приготування розчину, що містить близько 5 мг/мл сухого полісахариду, використовують мірну колбу підходящого об'єму. Вміст ампули кількісно переносять за допомогою води Р у колбу і доводять тим самим розчинником так, щоб у використуваному у випробуванні об'ємі розчину вміст рибози складав від 2.5 мкг до 25 мкг. Поміщають 0.20 мл і 0.40 мл розведеного розчину в пробірки, отримуючи три серії кожного розчину.

**Розчини порівняння.** Розчиняють 25 мг рибози Р у воді Р і доводять розчин цим самим розчинником до 100.0 мл (основний розчин; 0.25 г/л рибози). Безпосередньо перед використанням розводять 1 мл основного розчину до 10.0 мл водою Р (робоча концентрація: 25 мг/л рибози). Поміщають 0.10 мл; 0.20 мл; 0.40 мл; 0.60 мл; 0.80 мл і 1.0 мл робочої концентрації у 6 пробірок.

Готують холостий розчин, використовуючи 2 мл води Р.

Доводять об'єм у кожній пробірці до 2 мл, використовуючи воду Р. Струшують. Додають у кожную пробірку по 2 мл розчину 0.5 г/л заліза хлориду Р у кислоті хлористоводневій Р. Струшують. Додають 0.2 мл розчину 100 г/л орцину Р у етанолі Р. Пробірки поміщають на водяну баню на 20 хв. Охолоджують у льодяній воді. Вимірюють оптичну густину (2.2.25) кожного розчину за довжини хвилі 670 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційний розчин. За одержаними значеннями оптичної густини для 6 стандартних розчинів і відповідного вмісту рибози будують калібрувальну криву і визначають вміст рибози у випробовуваному розчині для кожного об'єму. Розраховують середнє з 3 одержаних значень.

### 2.5.33. ЗАГАЛЬНИЙ БЛОК

Багато аналітичних методик, описаних у даній загальній статті, можуть проводитися з використанням наявних у продажу наборів.

### МЕТОД І

Блок у розчині поглинає ультрафіолетове випромінювання за довжини хвилі 280 нм у зв'язку з наявністю в структурі білка ароматичних амінокислот, головним чином тирозину і триптофану. Дана

властивість білків може використовуватися з метою їх кількісного визначення. Якщо буферний розчин, використовуваний для розчинення білка, має велику оптичну густину відносно води, він містить речовини, що заважають. Вплив заважаючих речовин може бути усуненим використанням буферного розчину як компенсаційного розчину, але, якщо речовина, що заважає, має високу оптичну густину, отримані результати можуть проте викликати сумнів. При низьких концентраціях білка його адсорбція на кюветі може призвести до істотного зниження його концентрації у розчині. Цьому можна запобігти шляхом приготування зразків із високою концентрацією або використанням при приготуванні розчинів неіоногенних детергентів.

**Випробовуваний розчин.** Необхідну кількість випробовуваної речовини розчиняють у зазначеному буферному розчині для отримання розчину з концентрацією білка в інтервалі від 0.2 мг/мл до 2 мг/мл.

**Розчин порівняння.** Готують розчин відповідного стандартного зразка для визначуваного білка в тому самому буферному розчині і з тією самою концентрацією, що і у випробовуваного розчину.

**Методика.** При виконанні даного випробування випробовуваний розчин, розчин порівняння і компенсаційний розчин зберігають при однаковій температурі. Визначають оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину і розчину порівняння в кварцових кюветах за довжини хвилі 280 нм, використовуючи зазначений буферний розчин як компенсаційний розчин. Для отримання правильних результатів має спостерігатися лінійна залежність у діапазоні визначуваних концентрацій білка.

**Світлорозсіяння.** Правильність визначення білка може бути знижена за рахунок розсіяння світла розчином випробовуваного зразка. Якщо білок у розчині знаходиться у вигляді частинок, зіставних за розмірами з довжиною хвилі вимірюючого випромінювання (від 250 нм до 300 нм), розсіювання світлового потоку призводить до уявного збільшення оптичної густини розчину випробовуваного зразка. Щоб розрахувати оптичну густину за довжини хвилі 280 нм з урахуванням світлорозсіяння, визначають оптичну густину випробовуваного розчину за довжин хвиль - 320 нм, 325 нм, 330 нм, 335 нм, 340 нм, 345 нм і 350 нм. Будується графік залежності логарифмів виміряних оптичних густин від логарифмів довжин хвиль і, використовуючи лінійну регресію, визначають якнайкращу апроксимацію стандартної кривої. Для визначення логарифма оптичної густини за довжини хвилі 280 нм криву екстраполюють. Антилогарифм даного значення є оптичною густиною, визначуваною світлорозсіянням.

Виміряні значення коректують: із отриманої загальної оптичної густини, виміряної за довжини хвилі 280 нм, віднімають оптичну густину, визначувану світлорозсіянням, отримуючи таким чином оптичну густину білка в розчині. Для зменшення впливу світ-

лорозсіяння, особливо при помітній каламутності розчину, можна провести фільтрування, використовуючи неадсорбуючий білок (фільтр з розміром пір 0.2 мкм), або освітлення центрифугуванням.

**Розрахунки.** Для розрахунків використовують відкоректовані значення. Розраховують концентрацію білка у випробовуваному розчині ( $C_U$ ), використовуючи рівняння:

$$C_U = C_S(A_U/A_S),$$

де:

$C_S$  — концентрація білка в розчині порівняння;  
 $A_U$  і  $A_S$  — відкоректовані значення оптичної густини, отримані для випробовуваного розчину і розчину порівняння, відповідно.

## МЕТОД 2

Даний метод, звичайно званий методом Лоурі, заснований на відновленні білком фосфорномолібденвольфрамового змішаного кислого хромогену у фосфорномолібденвольфрамовому реактиві, що призводить до максимуму поглинання за 750 нм. Фосфорномолібденвольфрамовий реактив реагує, головним чином, із залишками тирозину в білку. Ступінь забарвлення досягає свого максимуму через проміжок часу від 20 хв до 30 хв при кімнатній температурі, після чого відбувається поступове знебарвлення. Оскільки даний метод є чутливим до речовин, що заважають, можна використовувати процедуру для осадження білка з випробовуваної проби. Більшість речовин, що заважають, викликають слабке забарвлення, хоча застосування деяких детергентів може викликати посилення забарвлення. Висока концентрація солей може викликати осадження білка. Оскільки різні види білка можуть давати різні за інтенсивністю забарвлення, стандартний зразок білка і випробовуваний білок мають бути аналогічними. Коли необхідне відділення речовин, що заважають, від білка у випробовуваному зразку, проводять процедуру, описану нижче для речовин, що заважають, перед приготуванням випробовуваного розчину. Вплив речовин, що заважають, може бути мінімізований розведенням, що забезпечує концентрацію випробовуваного білка на рівні, достатньому для проведення правильних вимірювань.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, вживаних в даному методі, використовують воду дистильовану Р.

**Випробовуваний розчин.** Кількість випробовуваної речовини, достатню для отримання розчину з концентрацією білка усередині діапазону концентрацій стандартної кривої, розчиняють у буферному розчині, зазначеному в окремій статті. Відповідний буферний розчин дає рН випробовуваного розчину від 10.0 до 10.5.

**Розчини порівняння.** Стандартний зразок випробовуваного білка розчиняють у буферному розчині,

## 2.5 Методи кількісного визначення

зазначеному в окремій статті. Порції даного розчину розводять таким самим буферним розчином, щоб отримати не менше п'яти розчинів порівняння з концентраціями білка, рівномірно розподіленими у підходящому інтервалі концентрацій у діапазоні від 5 мкг/мл до 100 мкг/мл.

**Холостий розчин.** Використовують буферний розчин, використовуваний для приготування випробовуваного розчину і розчинів порівняння.

**Реактив міді сульфату.** 100 мг міді (II) сульфату *P* і 0.2 натрію тартрату *P* розчиняють у воді дистильованій *P* і доводять об'єм розчину до 50 мл тим самим розчинником. 10 г натрію карбонату безводного *P* розчиняють у воді дистильованій *P* і доводять об'єм розчину до 50 мл тим самим розчинником. До розчину міді сульфату поволі при перемішуванні додають розчин натрію карбонату. Використовують упродовж 24 год.

**Реактив лужної міді.** Змішують реактив міді сульфату, розчин 50 г/л натрію додецилсульфату *P* і розчин 32 г/л натрію гідроксиду *P* у співвідношенні (1:2:1). Зберігають при кімнатній температурі і використовують упродовж 2 тижнів.

**Фосфоромолібденовольфрамовий реактив розведений.** Змішують 5 мл фосфоромолібденвольфрамового реактиву *P* з 55 мл води дистильованої *P*. Зберігають у посуді з темного скла при кімнатній температурі.

**Методика.** До 1.0 мл кожного з розчинів порівняння, випробовуваного розчину і холостого розчину додають 1.0 мл реактиву лужної міді і перемішують. Залишають на 10 хв. Потім додають 0.5 мл розведеного фосфоромолібденового реактиву, перемішують і залишають при кімнатній температурі на 30 хв. Визначають оптичну густину (2.2.25) розчинів за довжини хвилі 750 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційний розчин.

**Розрахунки.** Залежність оптичної густини розчину від концентрації білка в розчині не є лінійною; проте, якщо діапазон концентрацій, використовуваних для побудови стандартної кривої, достатньо невеликий, він близький до лінійності. Будують графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На підставі стандартної кривої і оптичної густини випробовуваного розчину визначають концентрацію білка у випробовуваному розчині.

**Заважаючі речовини.** В описаній нижче методиці дезоксихольовотрихлороцтову кислоту додають до випробовуваного зразка перед випробуванням для видалення заважаючих речовин шляхом осадження білка; дана методика може бути використана для концентрації білків з розведених розчинів.

До 1 мл розчину випробовуваної речовини додають 0.1 мл розчину 1.5 г/л натрію дезоксихолату *P*. Використовуючи вихрову мішалку, перемішують розчин і залишають при кімнатній температурі упродовж 10 хв. Потім додають 0.1 мл розчину 720 г/л трихлороцтової кислоти *P* і перемішують за допомогою вихрової мішалки. Центрифугують при прискоренні 3 000 g упродовж 30 хв, декантують і видаляють залишкову рідину піпеткою. Осад білка знову розчиняють в 1 мл реактиву лужної міді.

ристовуючи вихрову мішалку, перемішують розчин і залишають при кімнатній температурі упродовж 10 хв. Потім додають 0.1 мл розчину 720 г/л трихлороцтової кислоти *P* і перемішують за допомогою вихрової мішалки. Центрифугують при прискоренні 3 000 g упродовж 30 хв, декантують і видаляють залишкову рідину піпеткою. Осад білка знову розчиняють в 1 мл реактиву лужної міді.

### МЕТОД 3

Даний метод (звичайно званий визначенням за Бредфордом) заснований на зсуві поглинання з довжини хвилі 470 нм до 595 нм, спостережуваному при зв'язуванні білків фарбником кислотним синім 90. Фарбник кислотний синій 90 зв'язує найактивніше аргінінові і лізинові залишки в білку, що може призвести до похибки результатів при кількісному визначенні різних білків. Білки, використовувані як стандартна речовина, мають бути такими самими, як і білки, призначені для випробування. Речовин, що заважають випробуванню, відносно небагато, але все ж таки слід уникати детергентів і амфолітів у випробовуваному зразку. Високолужні проби можуть взаємодіяти з кислотними реактивами.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, вживаних у даному методі, використовують воду дистильовану *P*.

**Випробовуваний розчин.** Кількість випробовуваної речовини, достатню для отримання розчину з концентрацією білка усередині діапазону концентрацій стандартної кривої, розчиняють у буферному розчині, зазначеному в окремій статті.

**Розчини порівняння.** Стандартний зразок випробовуваного білка розчиняють у буферному розчині, зазначеному в окремій статті. Порції даного розчину розводять таким самим буферним розчином, щоб отримати не менше п'яти розчинів порівняння з концентраціями білка, рівномірно розподіленими у підходящому інтервалі концентрацій у діапазоні від 0.1 мг/мл до 1 мг/мл.

**Холостий розчин.** Використовують буферний розчин, використовуваний для приготування випробовуваного розчину і розчинів порівняння.

**Реактив кислотний синій 90.** 0.10 г реактиву кислотного синього 90 *P* розчиняють у 50 мл 96 % спирту *P*. Додають 100 мл кислоти фосфорної *P*, доводять об'єм розчину до 1000 мл водою дистильованою *P* і перемішують. Фільтрують розчин і зберігають у флаконі з темного скла при кімнатній температурі. У процесі зберігання спостерігається поступове випадання фарбника в осад. Перед використанням реактив слід профільтрувати.

**Методика.** До 0.100 мл кожного розчину порівняння, випробовуваного розчину і холостого розчину додають 5 мл реактиву кислотного синього 90. Перемішують, перевертаючи, уникаючи спінення, що

призводить до поганої відтворюваності. Визначають оптичну густину (2.2.25) розчинів порівняння і випробовуваного розчину за довжини хвилі 595 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційний розчин. Не використовують кварцові (кремнію діоксид) спектрофотометричні кювети, оскільки фарбник взаємодіє з цим матеріалом.

**Розрахунки.** Залежність оптичної густини розчину від концентрації білка в розчині не є лінійною; проте, якщо діапазон концентрацій, використовуваних для побудови стандартної кривої, достатньо невеликий, він близький до лінійності. Будують графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На основі стандартної кривої і оптичної густини випробовуваного розчину визначають концентрацію білка у випробовуваному розчині.

#### МЕТОД 4

Даний метод (зазвичай званий методом біцинхонічної (біхинової) кислоти або БХК методом) заснований на відновленні білком міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ) іона до міді ( $\text{Cu}^{1+}$ ) іона. Реактив біцинхонічної кислоти використовують для визначення іонів одновалентної міді. Проведенню реакції заважають декілька речовин. Вплив речовин, що заважають, може бути мінімізований розведенням, що забезпечує концентрацію випробовуваного білка на рівні, достатньому для проведення точних вимірювань. Як альтернатива для видалення речовин, що заважають, може бути використана процедура осадження білка, описана в методі 2. Оскільки різні види білка можуть давати різні за інтенсивністю забарвлення, стандартний зразок білка і випробовуваний білок мають бути аналогічними.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, застосовуваних в даному методі, використовують воду дистильовану Р.

**Випробовуваний розчин.** Кількість випробовуваної речовини, достатню для отримання розчину з концентрацією білка усередині діапазону концентрацій стандартної кривої, розчиняють у буферному розчині, зазначеному в окремій статті.

**Розчини порівняння.** Стандартний зразок випробовуваного білка розчиняють у буферному розчині, зазначеному в окремій статті. Порції даного розчину розводять таким самим буферним розчином, щоб отримати не менше п'яти розчинів порівняння з концентраціями білка, рівномірно розподіленими у підходящому інтервалі концентрацій у діапазоні від 10 мкг/мл до 1200 мкг/мл.

**Холостий розчин.** Використовують буферний розчин, використовуваний для приготування випробовуваного розчину і розчинів порівняння.

**БХК реактив.** 10 г динатрію біцинхонінату Р, 20 г натрію карбонату моногідрату Р, 1.6 г натрію тар-

трату Р, 4 г натрію гідроксиду Р і 9.5 г натрію гідрокарбонату Р розчиняють у воді дистильованій Р. Якщо необхідно, доводять рН розчину до 11.25, використовуючи розчин натрію гідроксиду Р або розчин натрію гідрокарбонату Р. Доводять об'єм до 1000 мл водою дистильованою Р і перемішують.

**Мідно-біцинхонінатовий реактив.** Змішують 1 мл розчину 40 г/л міді сульфату Р і 50 мл БХК реактиву.

**Методика.** Змішують 0.1 мл кожного розчину порівняння, випробовуваного розчину і холостого розчину з 2 мл мідно-БХК реактиву. Розчини витримують при температурі 37 °С упродовж 30 хв, відмічають час і залишають суміш до охолодження до кімнатної температури. Не пізніше як через 60 хв після закінчення термостатування визначають оптичну густину (2.2.25) розчинів порівняння і випробовуваного розчину в кварцових кюветах за довжини хвилі 562 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційний розчин. Після охолодження розчинів до кімнатної температури інтенсивність забарвлення продовжує поступово зростати.

**Розрахунки.** Залежність оптичної густини розчину від концентрації білка в розчині не є лінійною; проте, якщо діапазон концентрацій, використовуваних для побудови стандартної кривої, достатньо невеликий, він близький до лінійності. Будують графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На основі стандартної кривої і оптичної густини випробовуваного розчину визначають концентрацію білка у випробовуваному розчині.

#### МЕТОД 5

Даний метод (звичайно званий біуретовим методом) заснований на взаємодії міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ) іона з білком у лужному середовищі, яка призводить до поглинання за довжини хвилі 545 нм. Це випробування виявляє мінімальну відмінність між еквівалентними зразками IgG і альбуміну. Додавання натрію гідроксиду і біуретового реактиву як комбінованого реактиву, недостатнє змішування після збільшення натрію гідроксиду або перевищення часу між додаванням натрію гідроксиду і додаванням біуретового реактиву дає більш високі значення для імуноглобуліну в порівнянні зі зразками альбуміну. Методика додавання трихлороцтової кислоти, використовувана для мінімізації впливу заважаючих речовин, також може використовуватися для визначення вмісту білка у випробовуваних зразках з концентрацією менше 500 мкг/мл.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, застосовуваних у даному методі, використовують воду дистильовану Р.

**Випробовуваний розчин.** Кількість випробовуваної речовини, достатню для отримання розчину з кон-

## 2.5 Метод кількісного визначення

центрацією білка усередині діапазону концентрацій стандартної кривої, розчиняють у розчині 9 г/л *натрію хлориду Р*.

**Розчини порівняння.** Стандартний зразок випробовуваного білка розчиняють у розчині 9 г/л *натрію хлориду Р*. Порції даного розчину розводять розчином 9 г/л *натрію хлориду Р*, щоб отримати не менше трьох розчинів порівняння з концентраціями білка, рівномірно розподіленими у підходячому інтервалі концентрацій у діапазоні від 0.5 мг/мл до 10 мг/мл.

**Холостий розчин.** Використовують розчин 9 г/л *натрію хлориду Р*.

**Біуретовий реактив.** 3.46 г *міді сульфату Р* розчиняють в 10 мл гарячої води дистильованої *Р* і залишають до охолодження (Розчин А). 34.6 г *натрію цитрату Р* і 20.0 г *натрію карбонату безводного Р* розчиняють у 80 мл гарячої води дистильованої *Р* і залишають до охолодження (Розчин В). Змішують розчини А і В і доводять об'єм водою дистильованою *Р* до 200 мл. Отриманий реактив використовують упродовж 6 міс. Реактив не підлягає використанню, якщо він стає каламутним або утворюється осад.

**Методика.** Змішують рівні об'єми випробовуваного розчину і розчину 60 г/л *натрію гідроксиду Р*. негайно додають біуретовий реактив у кількості, що дорівнює 0.4 об'єму випробовуваного розчину, і швидко перемішують. Залишають при температурі від 15 °С до 25 °С упродовж періоду часу не менше 15 хв. Не пізніше як через 90 хв після додавання біуретового реактиву визначають оптичну густину (2.2.25) розчинів порівняння і випробовуваного розчину за довжини хвилі 545 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційний розчин. Каламутні розчини і розчини з осадом непридатні для розрахунку концентрації білка.

**Розрахунки.** Залежність оптичної густини від концентрації білка має приблизно-лінійний характер у вибраному інтервалі концентрацій білка для розчинів порівняння. Будують графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. Розраховують коефіцієнт кореляції для стандартної кривої. Система вважається за придатну, якщо лінійна залежність має коефіцієнт кореляції не менше 0.99. На основ стандартної кривої і оптичної густини випробовуваного розчину визначають концентрацію білка у випробовуваному розчині.

**Заважаючі речовини.** Для мінімізації впливу заважаючих речовин білок може бути осаджений з розчину випробовуваного зразка таким чином: до 1 об'єму розчину випробовуваного зразка додають 0.1 об'єму розчину 500 г/л *кислоти трихлороцтової Р*, видаляють надосадовий шар рідини і осад розчиняють в невеликому об'ємі 0.5 М розчину *натрію гідроксиду Р*. Використовують отриманий розчин для приготування випробовуваного розчину.

## МЕТОД 6

Даний флюориметричний метод заснований на дериватизації білка *о*-фталальдегідом, що взаємодіє з первинними аміногрупами білка (*N*-кінцева амінокислота і  $\epsilon$ -аміногрупа лізинових залишків). Чутливість випробування може бути підвищена гідролізом білка перед додаванням *о*-фталальдегіду. Гідроліз робить  $\alpha$ -аміногрупу вхідних до структури білка амінокислот доступною для реакції з фталальдегідним реактивом. Для даної методики потрібна дуже мала кількість білка. Первинні аміни, такі як трис(гідроксиметил) амінометан і амінокислотні буферні розчини, взаємодіють з фталальдегідом, тому їх не слід додавати і необхідно видалити. Аміак при високих концентраціях взаємодіє з фталальдегідом. Флюоресценція, що отримується при взаємодії аміну з фталальдегідом, може бути нестабільною. Використання автоматизованих процедур для стандартизації даної методики може підвищити її правильність і прецизійність.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, застосовуваних у даному методі, використовують воду дистильовану *Р*.

**Випробовуваний розчин.** Кількість випробовуваної речовини, достатню для отримання розчину з концентрацією білка усередині діапазону концентрацій стандартної кривої, розчиняють у розчині 9 г/л *натрію хлориду Р*. Перед додаванням фталальдегідного реактиву встановлюють рН розчину від 8 до 10.5.

**Розчини порівняння.** Порції даного розчину розводять розчином 9 г/л *натрію хлориду Р*, щоб отримати не менше п'яти розчинів порівняння з концентраціями білка, рівномірно розподіленими у підходячому інтервалі концентрацій у діапазоні від 10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Перед додаванням фталальдегідного реактиву встановлюють рН розчину від 8 до 10.5.

**Холостий розчин.** Використовують розчин 9 г/л *натрію хлориду Р*.

**Боратний буферний розчин.** 61.83 г *кислоти борної Р* розчиняють у воді дистильованій *Р* і встановлюють рН 10.4 за допомогою розчину *калію гідроксиду Р*. Доводять об'єм розчину до 1000 мл водою дистильованою *Р* і перемішують.

**Фталальдегідний основний розчин.** 1.20 г *фталальдегіду Р* розчиняють у 1.5 мл *метанолу Р*, додають 100 мл боратного буферного розчину і перемішують. Додають 0.6 мл розчину 300 г/л *макрогал 23 лаурилового ефіру Р* і перемішують. Зберігають при кімнатній температурі і використовують упродовж 3 тиж.

**Фталальдегідний реактив.** До 5 мл фталальдегідного основного розчину додають 15 мкл *2-меркаптоетанолу Р*. Розчин готують не менше як за 30 хв до використання. Реактив придатний для використання упродовж 24 год.

**Методика.** Змішують 10 мкл випробовуваного розчину і кожного з розчинів порівняння з 0.1 мл фталальдегідного реактиву і залишають при кімнатній

температурі 15 хв. Додають 3 мл 0.5 М розчину натрію гідроксиду і перемішують. Визначають флюоресценцію (2.2.21) розчинів порівняння і випробовуваного розчину за довжини хвилі збудження 340 нм і довжини хвилі емісії від 440 нм до 455 нм. Вимірюють інтенсивність флюоресценції кожного розчину один раз, оскільки у процесі випромінювання знижується інтенсивність флюоресценції.

**Розрахунки.** Залежність флюоресценції від концентрації білка має лінійний характер. Будують графік залежності інтенсивності флюоресценції розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На основі стандартної кривої і інтенсивності флюоресценції випробовуваного розчину визначають концентрацію білка у випробовуваному розчині.

## МЕТОД 7

Даний метод заснований на визначенні вмісту азоту, за яким визначають вміст білка. Присутність інших азотвмісних речовин у випробовуваному зразку може чинити заважаючий вплив на визначення білка даним методом. Методики визначення азоту засновані на розщеплюванні випробовуваного зразка в процесі аналізу, але не обмежуються наявністю білка у водному середовищі.

**Методика А.** Проводять, як зазначено для визначення азоту після мінералізації сірчаною кислотою (2.5.9) або використовують прилад заводського виготовлення для визначення азоту за К'ельдалем.

**Методика В.** Аналіз проводять за допомогою приладу заводського виготовлення. У більшості приладів для аналізу азоту використовується піроліз (тобто спалювання зразка в струмі кисню при температурі близько 1000 °С), в результаті якого виділяється азоту оксид (NO) і інші оксиди азоту (NO<sub>x</sub>) з присутнього у випробовуваних речовинах азоту. У деяких приладах азоту оксид перетворюється в газоподібний азот, який кількісно визначають з використанням термокондуктометричного детектора. В інших приладах оксид азоту (NO) змішується з озоном (O<sub>3</sub>), утворюючи діоксид азоту (NO<sub>2</sub>\*) у збудженому стані, який при розпаді випускає випромінювання і може бути визначений кількісно за допомогою хемілюмінесцентного детектора. Для оптимізації введення проби і параметрів піролізу, а також для оцінки стабільності процесу аналізу використовують стандартний зразок білка, за відносною чистотою і складом подібний до випробовуваного білка.

**Розрахунки.** Концентрацію білка розраховують діленням вмісту азоту у випробовуваному зразку на відомий вміст азоту в білку. Відомий вміст азоту в білку можна визначити за хімічним складом білка або порівнянням з підходящим стандартним зразком.

### 2.5.34. ОЦТОВА КИСЛОТА В СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДАХ

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** Випробовуваний розчин готують, як зазначено в окремій статті. Концентрація пептиду в розчині може бути підібрана залежно від очікуваної кількості оцтової кислоти.

**Розчин порівняння.** Готують розчин 0.10 г/л кислоти оцтової льодяної Р у суміші: рухома фаза В - рухома фаза А (5:95).

Хроматографування може бути проведене на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з неіржавіючої сталі розміром 0.25 м × 4.6 мм, заповнена октадецилсилілкагелем для хроматографії Р з розміром частинок 5 мкм;
- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;
- рухома фаза А: розводять 0.7 мл кислоти фосфорної Р до 1000 мл водою Р, доводять рН до 3.0 розчином натрію гідроксиду концентрованим Р;
- рухома фаза В: метанол Р2;

Час (хв)	Рухома фаза А	Рухома фаза В
0-5	95	5
5-10	95→50	5→50
10-20	50	50
20-22	50→95	50→5
22-30	95	5

— детектування за довжини хвилі 210 нм.

Вводять по 10 мкл розчину порівняння і випробовуваного розчину. В одержаних хроматограмах пік, відповідний оцтовій кислоті, має час утримування від 3 хв до 4 хв. Базова лінія робить крутий підйом на початку лінійного градієнта, який відповідає елююванню пептидів з колонки. З отриманих хроматограм визначають вміст оцтової кислоти в пептиді.

### 2.5.35. ЗАКИС АЗОТУ У ГАЗАХ

Гази легко поглинають за одної або більше специфічних довжин хвиль. Цю властивість широко використовують для високовибіркового визначення їх концентрацій.

**Опис і принцип вимірювання.** Концентрацію закису азоту вуглецю в інших газах можна визначити з використанням інфрачервоного аналізатора.

Інфрачервоний аналізатор звичайно містить джерело випромінювання, що генерує інфрачервоне випромінювання в широкому діапазоні, оптичний пристрій, комірку для зразка та детектор. Оптичний пристрій може бути розташований перед або за коміркою для зразка і містить один або декілька оптичних фільтрів, через які проходить широкосмугове випромінювання. Оптичний пристрій у цьому разі вибірковий для закису азоту. Світловий промінь,



## 2.5 Методи кількісного визначення

який підлягає вимірюванню, проходить через комірку для зразка і може також проходити через комірку порівняння, якщо аналізатор влаштований таким чином (деякі використовувані електронні системи використовуються замість комірки порівняння).

Якщо в комірці для зразка знаходиться закис азоту, відбуватиметься поглинання енергії вимірюваного світлового променя відповідно до закону Ламберта-Бера і це викликатиме зміни в сигналі детектора. Даний сигнал, що детектується, порівнюється із сигналом, одержаним для комірки порівняння для одержання даних для розрахунку концентрації закису азоту. Сигнал, що генерується, піддається лінеаризації для того, щоб одержати в підсумку значення концентрації закису азоту. Для попередження попадання частинок у сенсор, які можуть стати причиною явища розсіяння світла, прилад забезпечений підходящим фільтром.

### 2.5.36. АНІЗИДИНОВЕ ЧИСЛО

Анізидинове число визначають як помножене на 100 значення оптичної густини, виміряне з використанням кювети завширшки 1 см розчину, що містить 1 г випробовуваної речовини в 100 мл суміші розчинників і реактивів відповідно до такої методики.

*Операції проводять швидко, наскільки це можливо, уникаючи дії ультрафіолетового випромінювання.*

*Випробовуваний розчин (а).* 0.500 г випробовуваної речовини розчиняють у *триметилпентані Р* і розводять до об'єму 25.0 мл тим самим розчинником.

*Випробовуваний розчин (b).* До 5.0 мл випробовуваного розчину (а) додають 1.0 мл розчину 2.5 г/л *п-анізидину Р* і *льодяної оцтової кислоти Р*, збовтують і зберігають у захищеному від світла місці.

*Розчин порівняння.* До 5.0 мл *триметилпентану Р* додають 1.0 мл розчину 2.5 г/л *п-анізидину Р* і *кислоти оцтової льодяної Р*, збовтують і зберігають в захищеному від світла місці.

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину (а) в максимумі за 350 нм, використовуючи *триметилпентан Р* як компенсаційний розчин. Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину (b) за 350 нм точно через 10 хв після його приготування, використовуючи розчин порівняння як компенсаційний розчин.

Розраховують анізидинове число за формулою:

$$\frac{25 \times (1.2A_1 - A_2)}{m}$$

де:

- $A_1$  — оптична густина випробовуваного розчину (b) за 350 нм;
- $A_2$  — оптична густина випробовуваного розчину (а) за 350 нм;
- $m$  — маса випробовуваної речовини у випробовуваному розчині (а), у грамах.

## 2.6. БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ

### 2.6.1. СТЕРИЛЬНІСТЬ

Випробування проводять для контролю субстанцій, готових лікарських засобів або виробів, у відповідності до вимог Фармакопеї мають бути стерильними. Однак задовільний результат аналізу означає лише те, що в умовах випробування у зразку не були виявлені життєздатні мікроорганізми. ■

### ЗАПОБІГАННЯ МІКРОБНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Випробування на стерильність проводять за асептичних умов. З метою досягнення таких умов навколишнє середовище має бути адаптоване до способу проведення випробування. Заходи, що вживаються для запобігання мікробного забруднення, не мають чинити впливу на мікроорганізми, які можуть бути виявлені в зразку в результаті випробування. Умови проведення випробування слід регулярно контролювати шляхом аналізу проб, відібраних відповідним чином у робочій зоні, та проведенням інших контрольних заходів. ■

### ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ТА ТЕМПЕРАТУРА ІНКУБАЦІЇ

Живильні середовища для випробування можуть бути приготовані, як наведено нижче, або можуть бути використані еквівалентні готові середовища за умови, що вони відповідають вимогам за ростовими властивостями.

Для проведення випробування на стерильність можуть бути використані живильні середовища, що наведені нижче. Рідке тіогліколеве середовище призначене насамперед для вирощування анаеробних бактерій, однак воно також підходить для виділення аеробних бактерій. Соево-казеїнове середовище призначене для вирощування грибів та аеробних бактерій.

■

#### Рідке тіогліколеве середовище

L-Цистин	0.5 г
Агар	0.75 г
Натрію хлорид	2.5 г
Глюкоза моногідрат/безводна	5.5 г/5.0 г
Дріжджовий екстракт (водорозчинний)	5.0 г
Панкреатичний гідролізат казеїну	15.0 г
Натрію тіогліколят або	0.5 г
Кислота тіогліколева	0.3 мл
Розчин резазурину натрію (розчин 1 г/л резазурину натрію), свіжоприготований	1.0 мл
Вода Р	1000 мл
pH середовища після стерилізації	7.1±0.2.

Змішують L-цистин, агар, натрію хлорид, глюкозу, водорозчинний дріжджовий екстракт панкреатичний гідролізат казеїну з водою Р і нагрівають до розчинення інгредієнтів. До одержаного розчину додають натрію тіогліколят або кислоту тіогліколеву та перемішують до розчинення. Якщо необхідно, додають 1 М розчин натрію гідроксиду так, щоб значення рН живильного середовища після стерилізації становило 7.1±0.2. Якщо необхідно, розчин нагрівають, не доводячи до кипіння, а потім фільтрують гарячим крізь зволожений паперовий фільтр. Додають розчин резазурину натрію та перемішують. Живильне середовище розливають у контейнери, які забезпечують таке співвідношення площі поверхні живильного середовища до його глибини, щоб на кінець періоду інкубації зміна кольору середовища, що свідчить про збільшення концентрації кисню, спостерігалася не більше як у верхній третині середовища. Стерилізують, застосовуючи валідований метод. Якщо середовище не призначене для негайного використання, його зберігають при температурі від 2 °С до 25 °С у стерильному повітронепроникному контейнері. Якщо більше верхньої третини середовища набуло рожевого кольору, середовище може бути один раз регенероване шляхом нагрівання контейнерів на водяній бані або плинною парою до зникнення рожевого кольору та наступного швидкого охолодження. Необхідно вживати заходів для попередження потраплення нестерильного повітря в середину контейнера. Не слід використовувати середовище після закінчення валідованого терміну зберігання.

Рідке тіогліколеве середовище інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С.

Для продуктів, що містять ртутний консервант та стерильність яких не може бути перевірена за допомогою методу мембранної фільтрації, замість соєво-казеїнового середовища може бути використане рідке тіогліколеве середовище, яке інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С, за умови що вона витримує випробування, яке описано в розділі «Ростові властивості». Випробування для аеробів, анаеробів та грибів».

Там, де це рекомендовано або зазначено в окремій статті, може бути використане альтернативне тіогліколеве середовище. Готують суміш того самого складу, що й рідке тіогліколеве середовище, за винятком агару та розчину резазурину натрію, стерилізують, як зазначено вище. Значення рН середовища після стерилізації має становити 7.1 ± 0.2. Перед використанням середовище нагрівають на водяній бані. Інкубацію проводять в анаеробних умовах при температурі від 30 °С до 35 °С. ▲

#### Соево-казеїнове живильне середовище

Панкреатичний гідролізат казеїну	17.0 г
Папаїновий гідролізат соєвої муки	3.0 г
Натрію хлорид	5.0 г

## 2.6. Біологічні випробування

Дикалію гідрофосфат	2.5 г
Глюкоза моногідрат/безводна	2.5 г/2,3 г
Вода Р	1000 мл

pH середовища після стерилізації —  $7.3 \pm 0.2$ .

Інгредієнти складу змішують із водою Р та злегка нагрівають до розчинення. Охолоджують розчин до кімнатної температури. Якщо необхідно, додають 1 М розчин натрію гідроксиду так, щоб значення рН живильного середовища після стерилізації становило  $7.3 \pm 0.2$ . Якщо необхідно, фільтрують для одержання прозорого середовища, розливають у підходящі посудини та стерилізують, застосовуючи валідований метод. Якщо середовище не призначене для негайного використання, його зберігають при температурі від 2 °С до 25 °С у стерильному щільно закупореному контейнері. Не слід використовувати середовище після закінчення валідованого періоду зберігання.

Соєво-казеїнове середовище інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С.

Використовувані живильні середовища мають задовольняти наведені нижче вимоги щодо стерильності та ростових властивостей. Випробування на відповідність живильних середовищ зазначеним вимогам проводять за наведеними нижче методиками перед випробуванням лікарського засобу на стерильність або одночасно з ним.

**Стерильність.** Порції живильних середовищ інкубують протягом 14 діб. Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися зростання мікроорганізмів.

**Ростові властивості. Випробування для аеробів, анаеробів та грибів.** Випробування проводять для кожної партії готового живильного середовища та для кожної партії середовища, що приготоване з сухого середовища або з окремих інгредієнтів. Рекомендовані тест-мікроорганізми наведені в Табл. 2.6.1.-1.

Порції рідкого тіогліколевого середовища інокують невеликою кількістю (не більше 100 КУО) кожного з таких видів мікроорганізмів: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Порції соєво-казеїнового середовища інокують невеликою кількістю (не більше 100 КУО)

таких видів мікроорганізмів: *Aspergillus brasiliensis*▲, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Використовують окремі порції середовища для кожного з тест-мікроорганізмів. Інкубують не більше трьох діб (для бактерій) і не більше п'яти діб (для грибів).

Робочу культуру, що використовують при випробуванні, одержують таким чином, щоб кількість пересівань, зроблена від вихідного тест-штаму, не перевищувала п'яти.

Середовище вважають придатним для подальшого використання, якщо після закінчення періоду інкубації в ньому спостерігається виразно видиме зростання мікроорганізмів.

### ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ВИПРОБУВАННЯ

Проводять випробування відповідно до методики, наведеної нижче у розділі «Випробування лікарського засобу на стерильність», але з такими змінами.

**Випробування методом мембранної фільтрації.** Вміст контейнера(ів) із випробовуваним зразком пропускають крізь мембранний фільтр, мембранний фільтр відмивають, додавши до останньої порції стерильного розчинника невелику кількість (не більше 100 КУО) відповідного тест-мікроорганізму.

**Випробування методом прямого висівання.** Вміст контейнера(ів) з випробовуваним зразком (для кетгугу та інших шовних матеріалів для ветеринарії — нитки) вносять у живильне середовище, потім інокують середовище невеликою кількістю (не більше 100 КУО) відповідного тест-мікроорганізму.

Незалежно від методу випробування, використовують мікроорганізми, наведені вище в розділі «Ростові властивості. Випробування для аеробів, анаеробів та грибів». Позитивний контрольний дослід проводять, як наведено вище в розділі «Ростові властивості. Випробування для аеробів, анаеробів та грибів». Усі посіви інкубують не більше п'яти діб.

Якщо після закінчення періоду інкубації у посівах, що містять лікарський засіб, спостерігається вираз-

Таблиця 2.6.1.-1.

▼ Штами тест-мікроорганізмів, рекомендовані для контролю ростових властивостей живильних середовищ і для перевірки придатності методики

Аеробні бактерії	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, ▼NBRC 13276▲
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, ▼NBRC 3134▲
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, ▼NBRC 13275▲
Анаеробні бактерії	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, ▼NBRC 14293▲
Гриби	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, ▼NBRC 1594▲
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ▲	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, ▼NBRC 9455▲

но видіме зростання тест-мікроорганізмів, що не поступається за інтенсивністю контролю, то вважають, що випробовуваний лікарський засіб або не має антимікробної активності за умов випробування на стерильність, або антимікробна активність повністю нейтралізується. У подальшому випробування на стерильність проводять без зміни методики.

Якщо після закінчення періоду інкубації у посівах, що містять лікарський засіб, виразно видіме зростання тест-мікроорганізму відсутнє або поступається за інтенсивністю контролю, то вважають, що антимікробна активність лікарського засобу в умовах випробування на стерильність не була повністю нейтралізована. Змінюють умови випробування так, щоб повністю нейтралізувати антимікробну активність, та повторюють перевірку придатності методики.

Перевірку придатності методики проводять:

- а) при випробуванні на стерильність нового лікарського засобу;
- б) завжди при внесенні зміни в умови проведення випробування на стерильність.

Допускається проведення перевірки придатності методики одночасно з випробуванням лікарського засобу на стерильність.

## ВИПРОБУВАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА СТЕРИЛЬНІСТЬ

Випробування проводять, використовуючи метод мембранної фільтрації або метод прямого висівання. Проводять відповідні негативні контрольні дослідження. Метод мембранної фільтрації треба використовувати в усіх випадках, коли природа випробовуваного лікарського засобу це дозволяє — для випробування лікарських засобів у вигляді водних розчинів, що піддаються фільтрації, спиртових або олійних лікарських засобів, лікарських засобів, які змішуються або розчиняються у водних або олійних розчинниках, що не мають антимікробної активності за умов випробування.

**Випробування методом мембранної фільтрації.** Використовують мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0,45 мкм, здатні ефективно затримувати мікроорганізми. Для водних, розведених спиртових розчинів та розчинів в оліях використовують, наприклад, целюлозно-нітратні мембранні фільтри, а для концентрованих спиртових розчинів — целюлозно-ацетатні мембранні фільтри. Якщо необхідно, для деяких лікарських засобів, наприклад для антибіотиків, можуть бути використані спеціальні мембранні фільтри.

Використовують мембранні фільтри діаметром близько 50 мм. При використанні мембранних фільтрів іншого діаметра об'єм розчинника і промивної рідини змінюють відповідним чином. Фільтраційну установку і мембранні фільтри стерилізують під-

ходячим способом. Конструкція фільтраційної установки має забезпечувати асептичні умови при внесенні та фільтрації лікарського засобу, а також при видаленні мембранного фільтра для переносу його у живильне середовище або має дозволяти проводити інкубацію посівів безпосередньо у самій установці після додавання в неї живильного середовища.

**Водні розчини.** Перед початком випробування рекомендується пропустити крізь мембранний фільтр невелику кількість підходящого стерильного розчинника, наприклад, нейтрального розчину 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону з рН  $7.1 \pm 0.2$ . Розчинник може містити відповідні нейтралізатори і/або відповідні інактиватори, наприклад, при випробуванні антибіотиків.

Вміст контейнера(ів) з випробовуваним зразком переносять на мембранний фільтр або мембранні фільтри. Якщо необхідно, попередньо доводять об'єм зразка відповідним стерильним розчинником до того самого об'єму, що і при перевірці придатності методики. У будь-якому разі кількість лікарського засобу, взята для аналізу, має бути не менше зазначеної у Табл. 2.6.1.-2. Відразу фільтрують. Якщо лікарський засіб має антимікробну активність в умовах випробування, мембранний фільтр відмивають не менше трьох разів, пропускаючи крізь нього при кожному відмиванні той самий об'єм вибраного стерильного розчинника, що і при перевірці придатності методики. Загальний об'єм промивної рідини не має перевищувати п'яти порцій по 100 мл на один мембранний фільтр, навіть у тому разі, коли при перевірці придатності методики встановлено, що такий режим відмивання мембранних фільтрів не дозволяє повністю усунути антимікробну активність лікарського засобу. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище або розрізають його, дотримуючись правил асептики, на дві рівні частини, кожна з яких помішають у відповідне живильне середовище. Використовують ті самі кількості живильного середовища, що і при перевірці придатності методики. При використанні установок закритого типу живильне середовище вносять безпосередньо в установку. Посіви інкубують не менше 14 діб.

**Тверді розчинні речовини.** Кількість лікарського засобу, взята для висівання на кожне живильне середовище, має бути не менше зазначеної в Табл. 2.6.1.-2. Зразок розчиняють у підходящому розчиннику, наприклад у розчиннику, що додається до препарату, воді для ін'єкцій, фізіологічному розчині або нейтральному розчині 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону, та проводять випробування, як описано для водних розчинів, використовуючи тип мембранних фільтрів відповідно до вибраного розчинника.

**Олії та розчини в оліях.** Кількість лікарського засобу, взята для висівання на кожне живильне середовище, має бути не менше зазначеної в Табл. 2.6.1.-2. Олії та розчини в оліях з досить малою в'язкістю допускається фільтрувати крізь сухий мембранний

## 2.6. Біологічні випробування

Фільтр без попереднього розведення. В'язкі олії, якщо необхідно, розчиняють у підходящому стерильному розчиннику, наприклад ізопропілміристаті, який не виявляє антимікробної активності за умов випробування. Дають можливість олії проникнути в пори мембранного фільтра самопливом, а потім фільтрують, використовуючи тиск або вакуум. Мембранний фільтр відмивають не менше трьох разів, пропускаючи крізь нього шоразу близько 100 мл відповідної стерильної промивної рідини, наприклад нейтрального розчину 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону, що містить підходящий емульгатор у тій самій кількості, що і при перевірці придатності методики, наприклад полісорбат-80 в концентрації 10 г/л. Мембранний фільтр або мембранні фільтри поміщають у живильне середовище або живильні середовища або вносять живильне середовище у фільтраційну установку й інкубують, як описано для водних розчинів, при тих самих значеннях температури протягом того самого часу.

**Мазі та креми.** Кількість лікарського засобу, взята для висівання на кожне живильне середовище, має бути не менше зазначеної в Табл. 2.6.1.-2. Мазі на жировій основі й емульсії типу вода/олія допускається розводити ізопропілміристатом до 1 %, як наведено вище, використовуючи, якщо необхідно, нагрівання до температури не більше 40 °С. У виняткових випадках допускається нагрівання до температури не більше 44 °С. Фільтрацію проводять відразу з максимально можливою швидкістю. Далі випробування проводять, як описано вище для олій та розчинів в оліях.

**Випробування методом прямого висівання.** Випробований лікарський засіб вносять безпосередньо у живильне середовище в кількості, зазначеній у Табл. 2.6.1.-2. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, кількість лікарського засобу має становити не більше 10 % від об'єму живильного середовища.

Якщо лікарський засіб має антимікробну активність за умов випробування, її нейтралізують шляхом додавання підходящих нейтралізаторів або збільшення об'єму живильного середовища. Якщо для висівання необхідно використати велику кількість зразка, то краще застосовувати концентроване живильне середовище, приготоване з урахуванням подальшого розведення. Там, де це можливо, концентроване живильне середовище рекомендується додавати безпосередньо у контейнер з лікарським засобом.

**Рідини, що містять олії.** Використовують живильні середовища, до яких додають підходящий емульгатор у тій самій кількості, що і при перевірці придатності методики, наприклад полісорбат-80 в концентрації 10 г/л.

**Мазі та креми.** Лікарський засіб емульгують у розведенні 1:10 за допомогою підходящого емульгатора у підходящому стерильному розчиннику, наприклад нейтральному розчині 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону. Одержану емульсію вносять у живильне середовище, яке не містить емульгатора.

Посіви інкубують не менше 14 діб. Посіви переглядають кілька разів у період інкубації. Посіви олійних лікарських засобів щодня обережно струшують. Однак, якщо **▲** рідке **■** тіогліколеве **■** середовище застосовується для виявлення анаеробних мікроорганізмів, струшування або перемішування має бути зведено до мінімуму для того, щоб не порушувати анаеробних умов.

**Кетгут та інші шовні матеріали для ветеринарії.** Кількість зразка, взята для висівання на кожне живильне середовище, має бути не меншою від зазначеної в Табл. 2.6.1.-2. Розкривають упаковку, дотримуючись правил асептики, та переносять по три відрізки, відібрані від початку, середини та кінця нитки, у кожне живильне середовище. Довжина кожного відрізка

Таблиця 2.6.1.-2

*Мінімальна кількість готового лікарського засобу, необхідна для висівання на кожне живильне середовище*

Кількість готового лікарського засобу в одному контейнері	Мінімальна кількість зразка, яку необхідно використовувати для висівання на кожне живильне середовище, якщо немає інших зазначень в окремій статті
<i>Рідини</i>	
— менше 1 мл	Увесь вміст кожного контейнера
— 1-40 мл	Половина вмісту кожного контейнера, але не менше 1 мл
— більше 40 мл, але не більше 100 мл	20 мл
— більше 100 мл	10 % від вмісту контейнера, але не менше 20 мл
<i>Рідини, що містять антибіотики ■</i>	1 мл
<i>Нерозчинні лікарські засоби, креми та мазі, які емульгують або суспендують</i>	Увесь вміст кожного контейнера, але не менше 200 мг
<i>Порошки</i>	
— менше 50 мг	Увесь вміст кожного контейнера
— 50 мг і більше, але не більше 300 мг	Половина вмісту кожного контейнера, але не менше 50 мг
— від 300 мг до 5 г	150 мг
— більше 5 г	500 мг
<i>Кетгут та інші шовні матеріали для ветеринарії</i>	3 відрізки нитки (по 30 см кожний)

має становити 30 см. При випробуванні матеріалів у касетній упаковці використовують усю нитку. Кожний відрізок нитки вносять у відповідне живильне середовище. Живильне середовище має цілком покривати випробовуваний матеріал (використовують від 20 мл до 150 мл живильного середовища).

## ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Посіви переглядають періодично під час та після закінчення інкубаційного періоду, відмічаючи наявність візуально виявлюваного зростання мікроорганізмів. Якщо випробовуваний зразок викликає помутніння живильного середовища, яке робить неможливим візуальний облік, то через 14 діб після початку інкубації з кожної посудини переносять порції середовища (не менше 1 мл кожна) в нові посудини з тим самим живильним середовищем. Продовжують інкубацію вихідних і повторних посівів протягом не менше чотирьох діб.

Лікарський засіб витримує випробування на стерильність, якщо при візуальному обліку не виявляється зростання мікроорганізмів. При наявності зростання мікроорганізмів вважають, що лікарський засіб не витримує випробування на стерильність, якщо не доведена невірогідність результатів випробування, що викликана причинами, не пов'язаними з випробовуваним лікарським засобом. Результати випробування можуть бути визнані невірогідними, тільки якщо виконується одна або кілька з умов, наведених нижче:

- одержані незадовільні результати мікробіологічного контролю навколишнього середовища в ході проведення випробування на стерильність;
- виявлені помилки, допущені в ході випробування;
- виявлене зростання мікроорганізмів у негативних контролях;
- після ідентифікації мікроорганізмів, виділених з лікарського засобу, однозначно визнано, що причиною виникнення росту цього виду або видів є матеріали та/або технічні прийоми, використані при випробуванні на стерильність.

Якщо результати випробування визнані невірогідними, його повторюють на тій самій кількості зразків, що й початкове.

Якщо в результаті повторного випробування не було виявлено зростання мікроорганізмів, вважають, що лікарський засіб витримує випробування на стерильність. Якщо в результаті повторного випробування було виявлено зростання мікроорганізмів, то лікарський засіб не витримує випробування на стерильність.

## КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТІ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ, ОФТАЛЬМОЛОГІЧНИХ ТА ІНШИХ НЕІН'ЕКЦІЙНИХ ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ДО ЯКИХ ВИСУВАЮТЬСЯ ВИМОГИ ЩОДО СТЕРИЛЬНОСТІ

При випробуванні методом мембранної фільтрації використовують, якщо це можливо, увесь вміст

Таблиця 2.6.1.-3

Мінімальні кількості контейнерів для аналізу

Кількість контейнерів у серії*	Мінімальна кількість контейнерів, необхідна для випробування на стерильність на кожному живильному середовищі, якщо немає інших зазначень в окремій статті **
<i>Парентеральні готові лікарські засоби</i> — Не більше 100 контейнерів — Більше 100, але не більше 500 контейнерів — Більше 500 контейнерів	10 % від серії, але не менше 4 контейнерів 10 контейнерів 2 % від серії, але не більше 20 контейнерів ▼ (10 контейнерів лікарських засобів для парентерального застосування великого об'єму) ▲
<i>Офтальмологічні й інші неін'екційні готові лікарські засоби</i> — Не більше 200 контейнерів — Більше 200 контейнерів — Якщо готовий лікарський засіб випускається в однодозових контейнерах, мінімальну кількість контейнерів, необхідну для випробування, визначають, як наведено вище для парентеральних готових лікарських засобів	5 % від серії, але не менше 2 контейнерів 10 контейнерів
<i>Кетгут та інші шовні матеріали для ветеринарії</i>	2 % від серії, але не менше 5 і не більше 20 контейнерів
<i>Порошки в упаковці «in bulk»</i> — 4 контейнери або менше — Більше 4, але не більше 50 контейнерів — Більше 50 контейнерів	Кожний контейнер 20 % від серії, але не менше 4 контейнерів 2 % від серії, але не менше 10 контейнерів
<p>▼* Якщо розмір серії не відомий, використовують максимальну передбачену кількість контейнерів ▲</p> <p>▼** Якщо вміст одного контейнера є достатнім для висівання на двох середовищах, то в цьому стовпчику наведена кількість контейнерів, необхідна для висівання на два живильних середовища</p>	

## 2.6. Біологічні випробування

контейнера, але не менше кількості, зазначеної у Табл. 2.6.1.-2. Якщо необхідно, доводять об'єм зразка до 100 мл відповідним стерильним розчинником, наприклад нейтральним розчином 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону.

При випробуванні методом прямого висівання використовують кількість зразка, що зазначена в Табл. 2.6.1.-2, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Із кожного контейнера проводять висівання на середовище для виявлення бактерій і на середовище для виявлення грибів. Якщо об'єм або кількість лікарського засобу в одному контейнері недостатні для проведення випробування, використовують вміст двох або більше контейнерів для висівання на різні живильні середовища.

### МІНІМАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ КОНТЕЙНЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

Мінімальна кількість зразків для аналізу в залежності від кількості контейнерів у серії наведена в Табл. 2.6.1.-3.

Рекомендації щодо застосування випробування на стерильність наведені в статті (5.1.9).

N

### РОЗЧИННИКИ ТА ПРОМИВНІ РІДИНИ

Для розчинення лікарських засобів та відмивання мембранних фільтрів можуть бути використані розчинники, які не мають антимікробної активності за умов випробування. Рекомендовані розчинники та промивні рідини наведені нижче.

#### Розчин 9 г/л натрію хлориду Р (фізіологічний розчин)

##### Рідина № 1

Пептон ферментативний	1 г
Вода очищена	1000 мл

pH після стерилізації  $7.1 \pm 0.2$

##### Рідина № 2

Пептон ферментативний	5 г
Полісорбат-80	10 г
Вода очищена	1000 мл

pH після стерилізації  $7.1 \pm 0.2$

Стерилізують у паровому стерилізаторі, як наведено вище для живильних середовищ.

### ТЕСТ-МІКРООРГАНІЗМИ

При перевірці придатності методики і для контролю ростових властивостей живильних середовищ також можуть бути використані такі штами тест-мікроорганізмів:

— замість тест-мікроорганізму *Candida albicans* ATCC 10231 (IP 48. 72, ATCC 2091, IP 1180. 79) може бути використаний тест-мікроорганізм *Candida albicans* УКМ Y-1918 (ATCC 885-653; ГИСК 259);

— замість тест-мікроорганізму *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 (CIP 79.3) може бути використаний тест-мікроорганізм *Clostridium sporogenes* ГИСК 272.

### 2.6.2. МІКОБАКТЕРІЇ

Якщо випробовуваний зразок, можливо забруднений мікроорганізмами, крім мікобактерій, його обробляють підходящим деконтамінуючим розчином, наприклад, розчином ацетилцистеїну та гідроксиду натрію або розчином натрію лаурилсульфату.

Висівають по 0.2 мл зразка в трьох повторюваннях на поверхню кожного з 2 підходящих густих живильних середовищ (наприклад, середовище Левенштейна-Йенсена та середовище Міддлбрека 7Н 10). Висівають по 0.5 мл зразка також у трьох повторюваннях у підхоже рідке живильне середовище. Усі середовища інкубують при температурі 37 °С упродовж 56 діб.

Встановлюють ростові властивості живильного середовища в присутності випробовуваного препарату шляхом інокуляції середовища підходящим штамом сімейства *Mycobacterium sp*, наприклад, *BCG*, та якщо необхідно, використовують підходящий нейтралізуючий агент.

Якщо протягом перших восьми діб інкубації спостерігається зростання сторонніх мікроорганізмів, випробування повторюють із одночасним проведенням випробування на стерильність.

Препарат витримує випробування, якщо в кінці інкубаційного періоду на жодному з живильних середовищ не спостерігається зростання мікобактерій.

### 2.6.9. АНОМАЛЬНА ТОКСИЧНІСТЬ

#### ЗАГАЛЬНЕ ВИПРОБУВАННЯ

Кількість випробовуваного лікарського засобу, зазначену в окремій статті, розчинену в 0.5 мл води для ін'єкцій Р або у стерильному розчині 9 г/л натрію хлориду Р, вводять внутрішньовенно кожній з п'яти здорових мишей масою від 17 г до 24 г. Розчин уводять протягом інтервалу часу від 15 с до 30 с, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Зразок витримує випробування, якщо жодна з мишей не гине в межах 24 год або протягом часу, зазначеного в окремій статті. Якщо більше як одна тварина гине, зразок не проходить випробування. У разі загибелі однієї тварини, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не гине в межах зазначеного інтервалу часу.

## ІМУННІ СИРОВАТКИ ТА ВАКЦИНИ ДЛЯ ЛЮДИНИ

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, вводять внутрішньоочередно одну дозу для людини, але не більше 1 мл кожній з п'яти здорових мишей масою від 17 г до 24 г. Дозу для людини зазначають на етикетці випробовуваного лікарського засобу або у супровідному документі. Спостерігають за тваринами протягом 7 діб. Зразок витримує випробування, якщо у жодної з тварин не виявляються ознаки інтоксикації. Якщо більше ніж одна тварина гине, зразок не відповідає вимогам. Якщо одна з тварин виявляє ознаки інтоксикації або гине, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не виявляє ознак інтоксикації або не гине у межах зазначеного часу.

Випробування також має бути проведене на двох здорових мурчаках масою від 250 г до 400 г. Вводять внутрішньоочередно кожній тварині одну дозу для людини випробовуваного лікарського засобу, але не більше 5 мл. Дозу для людини зазначають на етикетці лікарського засобу або у супровідному документі. Спостерігають за тваринами протягом 7 діб. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин не виявляє ознак інтоксикації. У разі загибелі більше як однієї тварини зразок не відповідає вимогам. Якщо одна з тварин виявляє ознаки інтоксикації або гине, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не виявляє ознак інтоксикації та не гине протягом зазначеного часу.

N

Випробування на аномальну токсичність виконують з метою виключення небезпеки підвищення рівня токсичності лікарського засобу, якщо в його складі при виробництві або зберіганні відбулися зміни, непередбачені регламентом виробництва або окремою статтею.

## ЗАГАЛЬНЕ ВИПРОБУВАННЯ

Випробування проводять на білих мишах, на яких раніше не проводили ніяких випробувань і яких утримують у стандартних умовах на повноцінному збалансованому харчуванні.

Розчинні лікарські засоби вводять внутрішньовенно, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Лікарські засоби у вигляді суспензій вводять внутрішньоочередно в об'ємі не більше 1 мл з швидкістю 0.1 мл/с.

Зразок витримує випробування, якщо протягом 24 год після ін'єкції або у межах часу, зазначеного в окремій статті, жодна з 5 мишей не загине та не більше як у 1 миші спостерігаються ознаки інтоксикації, характер та вияв яких перевищують допустимий рівень, зазначений в окремій статті. Якщо

гине 1 з 5 мишей або симптоми нерегламентованої інтоксикації виявляються більше як у 1 із 5 мишей випробування повторюють ще на 5 мишах. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не гине.

### 2.6.10. ГІСТАМІН

Мурчака (гвінейську свинку) масою від 250 г до 350 г, позбавленого їжі за 24 год до експерименту, піддають евтаназії. Витягують ділянку периферійної тонкої кишки завдовжки 2 см і спорожняють відокремлену частину шляхом ретельної промивки за допомогою шприця розчином В, наведеним нижче. До кожного з кінців приєднують тонку нитку та роблять невеликий поперечний розріз в центрі фрагмента кишки. Помішають її у ванночку для органів місткістю від 10 мл до 20 мл, що містить розчин В. Розчин підтримують при постійній температурі (від 34 °С до 36 °С), і пропускають через розчин суміш 95 частин кисню та 5 частин діоксиду вуглецю. Укріплюють одну з ниток на дні ванночки для органів. Іншу нитку приєднують до ізотонічного міографа та безперервно реєструють скорочення органу за допомогою кімографа або іншим підходящим способом реєстрації. Якщо використовується важіль, його довжина має бути такою, щоб рух органу посилювався приблизно в 20 разів. Натягнення кишки має складати близько 9.8 мН (1 г) і бути відрегульовано відповідно до чутливості органу. Промивають ванночку для органів розчином В. Витримують протягом 10 хв. Промивку розчином В повторюють ще 2 або 3 рази. Стимулюють серію скорочень шляхом додавання фіксованих (вимірних) об'ємів від 0.2 мл до 0.5 мл розчину *гістаміну дигідрохлориду Р*, що має концентрацію, яка викликає відтворені субмаксимальні реакції. Цю дозу позначають як «високу дозу». Перед кожним додаванням гістаміну ванночку для органів тричі промивають розчином В (переважно шляхом переповнювання без спорожнення ванночки). Послідовні додавання слід виконувати, дотримуючись рівних інтервалів часу, достатніх для повної релаксації між додаваннями гістаміну (близько 2 хв). Додають рівні об'єми більш розбавленого розчину *гістаміну дигідрохлориду Р*, що призводить до відтворення реакцій, що складають приблизно половину від реакцій, які викликаються «високою дозою». Цю дозу позначають як «низьку дозу». Продовжують періодичне додавання «високих» та «низьких» доз розчину гістаміну, дотримуючись вищезгаданого, і чергують кожне додавання з рівним об'ємом розведення випробовуваного розчину, регулюючи ступінь розведення так, щоб скорочення кишки, у разі його наявності, було меншим за скорочення, що викликається «високою дозою» гістаміну. Визначають, чи є скорочення, у разі його наявності, відтворюваним та чи залишаються реакції на «високу» та «низьку» дози гістаміну незмінними. Грунтуючись на визначеному вище розведенні обчислюють



## 2.6. Біологічні випробування

активність випробовуваної субстанції, виражену в її еквіваленті на мікрограм основи гістаміну.

Визначена таким чином кількість не має перевищувати кількість, зазначену в окремій статті.

Якщо випробовуваний розчин не викликає скорочень, готують свіжий розчин, додаючи кількість гістаміну, відповідну максимально допустимій відповідно до вимог окремої статті, та відзначають, чи відповідають скорочення, що викликаються препаратом з додаванням гістаміну, кількості доданого гістаміну. Якщо така відповідність не спостерігається, скорочення, що викликається випробовуваною субстанцією, невідтворне або подальші реакції на «високі» та «низькі» дози гістаміну зменшуються, то результати випробування вважають за невірні, і виконують випробування на депресорні речовини (2.6.11).

### Розчин А

Натрію хлорид	160.0 г
Калію хлорид	4.0 г
Кальцію хлорид	2.0 г
Магнію хлорид	1.0 г
Натрію гідрофосфат додекагідрат	0.10 г
Вода для ін'єкцій Р	до 1000 мл

### Розчин В

Розчин А	50.0 мл
Атропіну сульфат	0.5 мг
Натрію гідрокарбонат	1.0 г
Глюкози моногідрат	0.5 г
Вода для ін'єкцій Р	до 1 000 мл

Розчин В має бути свіжоприготованим, і його використовують протягом 24 ч.

## 2.6.12. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ: ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА МІКРООРГАНІЗМІВ

### 1. ВСТУП

Випробування, наведені нижче, дозволяють здійснювати кількісне визначення мезофільних бактерій та грибів, здатних зростати за аеробних умов.

Випробування призначені насамперед для того, щоб визначити, чи відповідає лікарський засіб установленим вимогам щодо мікробіологічної чистоти. Якщо випробування проводять із цією метою, виконують зазначення, наведені нижче, зокрема відносно кількості зразків, що відбирають для випробування, та інтерпретують результати, як наведено нижче.

Методи, наведені в даній статті, не призначені для випробування лікарських засобів, які вміщують як діючі речовини життєздатні мікроорганізми.

Допускається використання альтернативних мікробіологічних методів, включаючи автоматизовані, за умови, що доведена їх еквівалентність методу, наведеному у Фармакопеї.

### 2. ЗАГАЛЬНІ ПРОЦЕДУРИ

Випробування проводять за умов, що забезпечують попередження стороннього мікробного забруднення випробовуваного лікарського засобу. Заходи, що вживають для запобігання мікробному забрудненню, не повинні впливати на мікроорганізми, які можуть бути виявлені при випробуванні.

Якщо випробовуваний лікарський засіб володіє антимікробною дією, то вона має бути по можливості усунена або нейтралізована. При використанні з цією метою інактиваторів слід довести їхню ефективність та нешкідливість для мікроорганізмів.

Якщо для приготування зразків використовують поверхнево-активні речовини, слід довести їхню нешкідливість для мікроорганізмів та сумісність з інактиваторами.

### 3. МЕТОДИ ПІДРАХУНКУ

Використовують метод мембранної фільтрації або метод підрахунку на чашках Петрі, як наведено нижче. Метод найбільш вірогідного числа (MPN), як правило, має меншу точність при визначенні числа мікроорганізмів, але для деяких груп лікарських засобів із дуже низьким мікробним забрудненням він може бути найбільш прийнятним методом.

При виборі методу випробування необхідно врахувати природу лікарського засобу та встановлений рівень мікробного забруднення. Методика повинна забезпечувати можливість випробування достатньої кількості зразка, щоб встановити відповідність лікарського засобу специфікації. Має бути доведена придатність вибраної методики.

### 4. РОСТОВІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ПІДРАХУНКУ ТА НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

#### 4-1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Слід довести здатність методики забезпечувати виявлення мікроорганізмів у присутності випробовуваного зразка.

Придатність методики слід підтверджувати, якщо в процедуру випробування або в лікарський засіб вносять зміни, здатні вплинути на результати випробування.

#### 4-2. ПІДГОТОВКА ТЕСТ-МІКРООРГАНІЗМІВ

Використовують стандартизовані стабільні суспензії тест-мікроорганізмів або готують їх, як наведено нижче. Пересівання тест-мікроорганізмів проводять таким чином, щоб життєздатні мікроорганізми, використовувані для інокуляції, були отримані за допомогою не більше як 5 пасажів вихідного тест-штаму. Тест-штами бактерій та грибів вирощують кожен окремо, як вказано в Табл. 2.6.12.-1.

Для приготування робочих суспензій тест-мікроорганізмів використовують буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном рН 7.0 або фосфатний буферний розчин рН 7.2; для приготування суспензії спор *A. brasiliensis* до буферного розчину може бути додано 0,05 % полісорбату-80. Робочі суспензії слід використовувати протягом 2 год або протягом 24 год, якщо їх зберігають при температурі від 2 °С до 8 °С. Як альтернатива приготуванню та подальшому розбавленню свіжої суспензії вегетативних клітин *A. brasiliensis* та *B. subtilis* може бути приготована стабільна суспензія спор, відповідний об'єм якої потім використовують для інокуляції. Стабільну суспензію спор допускається зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С протягом часу, встановленого при валідації.

#### 4-3. НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

Для контролю умов випробування проводять негативний контрольний дослід, використовуючи вибраний розчинник замість випробовуваного зразка. Зростання мікроорганізмів має бути відсутнім. Негативний контрольний дослід проводять також при випробуванні лікарських засобів, як наведено в розділі 5. Слід встановлювати причини незадовільного негативного контрольного дослід.

#### 4-4. РОСТОВІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Проводять перевірку кожної партії готового до використання живильного середовища та кожної партії середовища, приготованого з сухого середовища або окремих інгредієнтів.

Порції/чашки соєво-казеїнового бульйону та соєво-казеїнового агару інокують невеликою кількістю (не більше 100 КУО) тест-мікроорганізмів, вказаних в Табл. 2.6.12.-1, використовуючи окрему порцію середовища/чашку для кожного тест-мікроорганізму. Чашки Сабуро-декстрозного агару інокують невеликою кількістю (не більше 100 КУО) тест-мікроорганізмів, вказаних в Табл. 2.6.12.-1, використовуючи окрему чашку для кожного тест-мікроорганізму. Інкубують за умов, вказаних в Табл. 2.6.12.-1.

Для густих живильних середовищ число колоній, підраховане на випробовуваному живильному середовищі, повинно не більше як в два рази відрізн

ятися від стандартизованого інокуму. При використанні свіжоприготованого інокуму повинне спостерігатися зростання тест-мікроорганізмів, що не поступається за інтенсивністю зростанню на раніше перевіреній та визнаній придатною партії середовища. Рідкі живильні середовища вважають за придатні, якщо спостерігається виразно видиме зростання тест-мікроорганізмів, що не поступається за інтенсивністю зростанню в раніше перевіреній та визнаній придатною партії середовища.

#### 4-5. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ПІДРАХУНКУ У ПРИСУТНОСТІ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

4-5-1. Підготовка зразка. Методика підготовки зразка залежить від фізичних властивостей випробовуваного лікарського засобу. Якщо наведені нижче процедури не дають задовільного результату, можуть бути використані альтернативні процедури.

*Лікарські засоби, розчинні у воді.* Лікарський засіб розчиняють або розбавляють (як правило, використовують розведення 1:10) в буферному розчині з натрію хлоридом та пептоном рН 7.0, фосфатному буферному розчині рН 7.2 або соєво-казеїновому бульйоні. При необхідності встановлюють значення рН в інтервалі від 6 до 8. При необхідності подальші розведення готують за допомогою того ж розчинника.

*Нерозчинні у воді лікарські засоби, що не містять жири.* Лікарський засіб суспендують (як правило, використовують розведення 1:10) в буферному розчині з натрію хлоридом та пептоном рН 7.0, фосфатному буферному розчині рН 7.2 або соєво-казеїновому бульйоні. Для поліпшення суспендування субстанцій, що погано змочуються, до зразка може бути додана поверхнево-активна речовина, наприклад 1 г/л полісорбату-80. При необхідності встановлюють значення рН в інтервалі від 6 до 8. При необхідності подальші розведення готують за допомогою того ж розчинника.

*Лікарські засоби, що містять жири.* Лікарський засіб розчиняють в ізопропілміристаті, стерилізованому шляхом фільтрації, або змішують з мінімальною необхідною кількістю стерильного полісорбату-80 або іншої стерильної поверхнево-активної речовини, що не володіє антимікробною дією. При необхідності поверхнево-активну речовину підігрівають до температури не більше 40 °С, у виняткових випадках допускається підігрівання до температури не більше 45 °С. Ретельно перемішують, при необхідності підтримуючи температуру на водяній бані. Додають необхідну кількість заздалегідь підігрітого вибраного розчинника для отримання розведення випробовуваного лікарського засобу 1:10. Ретельно перемішують, підтримуючи температуру, протягом мінімального часу, необхідного для утворення емульсії. Подальші десятиразові розведення зразка можуть бути приготовані за допомогою того ж ви-

## 2.6. Біологічні випробування

браного розчинника, що містить відповідну концентрацію стерильного полісорбату-80 або іншої стерильної поверхнево-активної речовини, що не володіє антимікробною дією.

*Рідкі або тверді лікарські засоби у формі аерозолі.* Асептично переносять лікарський засіб в установку для мембранної фільтрації або в стерильний контейнер для подальшого випробування. Від кожного випробуваного контейнера використовують весь вміст або певну кількість доз.

*Трансдермальні пластири.* Трансдермальні пластири звільняють від захисного покриття (знімних прокладок) та поміщають їх в стерильні скляні або пластмасові лотки клейкою поверхнею догори. Покривають клейку поверхню стерильним пористим матеріалом, наприклад стерильною марлею, для запобігання злипанню та переносять пластири у відповідний об'єм вибраного розчинника, що містить інактиватори, наприклад полісорбат-80 та/або лецитин. Енергійно струшують не менше 30 хв.

**4-5-2. Інокуляція та розбавлення.** До зразка лікарського засобу, підготовленого, як наведено вище (4-5-1), та до контрольного зразка (що не містить випробуваного лікарського засобу) додають відповідний об'єм суспензії тест-мікроорганізму, щоб забезпечити інокулум, який містить не більше 100 КУО. Об'єм інокуляту не повинен перевищувати 1 % об'єму підготовленого зразка.

Для демонстрації прийняттого рівня виявлення мікроорганізмів з лікарського засобу для випробування використовують підготовлений зразок в найменшому з можливих розведень. Якщо це неможливо внаслідок антимікробної активності або поганої розчинності зразка, то використовують подальші відповідні розведення. У разі, коли не вдається уникнути пригнічення зростання тест-мікроорганізмів під впливом зразка допускається додавати суспензію мікроорганізмів після нейтралізації, розведення або фільтрації.

**4-5-3. Нейтралізація/усунення антимікробної активності.** Відповідно до процедури, наведеної в 4-5-4, проводять визначення числа мікроорганізмів в зразку, підготовленому, як наведено в 4-5-2, та порівнюють отримане значення з числом мікроорганізмів у контрольному досліді.

Якщо спостерігається пригнічення зростання тест-мікроорганізмів (зниження числа мікроорганізмів більше, ніж в два рази), необхідно внести зміни в окрему методику визначення числа мікроорганізмів з метою отримання вірогідних результатів випробування. Зміни методики можуть включати, наприклад: (1) збільшення об'єму розчинника або живильного середовища, (2) додавання до розчинника специфічних або неспецифічних інактиваторів, (3) використання методу мембранної фільтрації або (4) комбінацію наведених вище прийомів.

*Нейтралізатори.* Нейтралізатори можуть бути використані для нейтралізації антимікробної дії лі-

карських засобів (Табл. 2.6.12.-2). Вони можуть бути додані до вибраного розчинника або живильного середовища, найкраще перед стерилізацією. При використанні нейтралізаторів їх ефективність та нешкідливість для мікроорганізмів слід довести шляхом постановки контрольного досліді у присутності нейтралізатора та за відсутності випробуваного лікарського засобу.

Таблиця 2.6.12.-2

Загальноприйняті нейтралізуючі агенти

Тип сполуки	Можливий метод нейтралізації
Глютаральдегід, ртутні сполуки	Натрію гідросульфат (натрію бісульфіт)
Феноли, спирт, альдегіди, сорбати	Розбавлення
Альдегіди	Гліцин
Четвертинні амонієві сполуки (QACs), парагідроксibenзоати (парабени), біс-бігуаніди	Лецитин
QACs, йод, парабени	Полісорбат
Ртутні сполуки	Тіогліколят
Ртутні сполуки, галогени, альдегіди	Тіосульфат
EDTA (едетат)	Іони Mg <sup>2+</sup> або Ca <sup>2+</sup>

У разі, коли не вдається підібрати придатний метод усунення антимікробної дії, може бути визнано, що неможливість виявлення даного тест-мікроорганізму є наслідком мікробіцидної дії лікарського засобу. Це вказує на те, що ймовірність забруднення лікарського засобу даними видами мікроорганізмів мала. Проте існує можливість того, що лікарський засіб інгібує тільки деякі, вказані в даній статті, види мікроорганізмів, але не інгібує інші мікроорганізми, не включені в перелік або що відносяться до інших таксономічних груп. У зв'язку з цим проводять випробування, використовуючи максимальне розведення зразка з урахуванням рівня мікробного забруднення та встановленого критерію прийнятності.

**4-5-4. Виявлення мікроорганізмів у присутності випробуваного лікарського засобу.** Проводять окреме випробування для кожного з перерахованих в даній статті тест-мікроорганізмів. Проводять підрахунок тільки тест-мікроорганізму, який використовувався як інокулянт.

**4-5-4-1. Мембранна фільтрація.** Використовують мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм. Тип фільтрувального матеріалу слід вибирати так, щоб компоненти випробуваного зразка не впливали на його здатність затримувати мікроорганізми. Для кожного з тест-мікроорганізмів використовують один мембранний фільтр.

Підхожу кількість зразка, підготовленого, як наведено в розділах з 4-5-1 по 4-5-3 (як правило, відповідну 1 г випробуваного лікарського засобу або меншій його кількості в тому випадку, якщо очікується високий ступінь мікробної забрудненості), перено-

сять на мембранний фільтр, негайно фільтрують та відмивають мембранний фільтр підходящим об'ємом промивної рідини.

Мембранний фільтр, призначений для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС), поміщають на поверхню соєво-казеїнового агару. Для визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) мембранний фільтр поміщають на поверхню Сабуро-декстрозного агару. Інкують посіви, як вказано в Табл. 2.6.12.-1. Проводять підрахунок колоній.

4-5-4-2. *Метод висівання на чашки.* При випробуванні методом висівання на чашки використовують не менше двох чашок з кожним живильним середовищем та результат визначають як середнє арифметичне значення числа колоній, що виростили на всіх паралельних чашках.

4-5-4-2-1. *Метод глибинного висівання*

У кожену чашку Петрі діаметром 9 см вносять 1 мл випробовуваного зразка, підготовленого, як наведено в розділах з 4-5-1 по 4-5-3, та від 15 мл до 20 мл

соєво-казеїнового агару або Сабуро-декстрозного агару. Температура живильного середовища повинна складати не більше 45 °С. При використанні чашок Петрі більшого діаметра відповідно збільшують кількість живильного середовища. Для кожного з тест-мікроорганізмів, перерахованих в Табл. 2.6.12.-1, використовують не менше двох чашок Петрі. Інкують посіви як вказано в Табл. 2.6.12.-1. Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній тест-мікроорганізму на живильному середовищі та визначають число КУО в інокулумі.

4-5-4-2-2. *Метод поверхневого висівання*

У кожену чашку Петрі діаметром 9 см вносять від 15 мл до 20 мл розплавленого соєво-казеїнового агару або Сабуро-декстрозного агару з температурою близько 45 °С та дають середовищу застигнути. При використанні чашок Петрі більшого діаметра відповідно збільшують кількість живильного середовища. Підсушують чашки, наприклад, в ламінарному потоці стерильного повітря або в термостаті. Для кожного з тест-мікроорганізмів, наведених в Табл. 2.6.12.-1,

Таблиця 2.6.12-1

## Підготовка та використання тест-мікроорганізмів

Мікроорганізм	Підготовка тест-мікроорганізму	Ростові властивості		Придатність методу підрахунку в присутності лікарського засобу	
		Загальне число аеробних мікроорганізмів	Загальне число дріжджових та плісневих грибів	Загальне число анаеробних мікроорганізмів	Загальне число дріжджових та плісневих грибів
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульйон 30-35 °С 18-24 год	Соєво-казеїновий агар та соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—	Соєво-казеїновий агар / MPN соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульйон 30-35 °С 18-24 год	Соєво-казеїновий агар та соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—	Соєво-казеїновий агар / MPN соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульйон 30-35 °С 18-24 год	Соєво-казеїновий агар та соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—	Соєво-казеїновий агар / MPN соєво-казеїновий бульйон ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 3 доби	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Сабуро-декстрозний агар або Сабуро-декстрозний бульйон 20-25 °С 2-3 доби	Соєво-казеїновий агар ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 5 діб	Сабуро-декстрозний агар ≤ 100 КУО 20-25 °С ≤ 5 діб	Соєво-казеїновий агар ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 5 діб MPN: не використовують	Сабуро-декстрозний агар ≤ 100 КУО 20-25 °С ≤ 5 діб
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Сабуро-декстрозний агар або картопляно-декстрозний агар 20-25 °С 5-7 діб або до отримання добре розвинених спор	Соєво-казеїновий агар ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 5 діб	Сабуро-декстрозний агар ≤ 100 КУО 20-25 °С ≤ 5 діб	Соєво-казеїновий агар ≤ 100 КУО 30-35 °С ≤ 5 діб MPN: не використовують	Сабуро-декстрозний агар ≤ 100 КУО 20-25 °С ≤ 5 діб

## 2.6. Біологічні випробування

використовують не менше двох чашок Петрі. Точно відміряний об'єм (не менше 0,1 мл) випробовуваного зразка, підготовленого, як наведено в розділах з 4-5-1 по 4-5-3, розподіляють по поверхні живильного середовища. Інкують та проводять облік результатів, як наведено в розділі 4-5-4-2-1.

4-5-4-3. *Метод найбільш імовірного числа (MPN).* Метод найбільш імовірного числа (MPN) поступається за точністю методам мембранної фільтрації та висівання на чашки Петрі. Результати визначення

Таблиця 2.6.12.-3  
Найбільш імовірне число мікроорганізмів

Комбінація числа пробірок, що проросли в кожній групі			MPN в грамі або в мілілітрі лікарського засобу	95 % довірчі інтервали
Кількість грамів або мілілітрів лікарського засобу в пробірці				
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	<3	0-9.4
0	0	1	3	0.1-9.5
0	1	0	3	0.1-10
0	1	1	6.1	1.2-17
0	2	0	6.2	1.2-17
0	3	0	9.4	3.5-35
1	0	0	3.6	0.2-17
1	0	1	7.2	1.2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7.4	1.3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5.38
2	0	0	9.2	1.5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	2	2	35	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	90-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980
3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	>1100	

числа грибів, отримані даним методом, як правило, невірні. У зв'язку з цим використання методу MPN допускається лише для визначення ТАМС в тих випадках, коли неможливо застосувати інші методи. У разі, коли застосування методу MPN передбачено в окремій статті, випробування проводять, як наведено нижче.

Готують серії не менше ніж трьох послідовних десятиразових розведень випробовуваного лікарського засобу, підготовленого, як наведено в розділах з 4-5-1 по 4-5-3. Від кожного розведення відбирають три проби по 1 г або 1 мл, які вносять до трьох пробірок, що містять від 9 мл до 10 мл соєво-казеїнового бульйону. При необхідності в живильне середовище може бути додана відповідна поверхнево-активна речовина, наприклад полісорбат-80 або інактиватор. Таким чином, для трьох розведень використовують дев'ять пробірок.

Всі пробірки інкують при температурі від 30 °С до 35 °С не більше 3 діб. У тому випадку, коли у зв'язку з природою лікарського засобу візуальний облік результатів утруднений або сумнівний, проводять пересівання на те саме рідке живильне середовище або на соєво-казеїновий агар, інкують від 1 до 2 діб при тій самій температурі та враховують отримані результати. Визначають найбільш імовірне число мікроорганізмів у грамі або мілілітрі випробовуваного лікарського засобу відповідно до Табл. 2.6.12.-3.

### 4-6. ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

При перевірці придатності методики з використанням методу мембранної фільтрації або методу висівання на чашки для кожного з тест-мікроорганізмів середнє арифметичне значення числа колоній, отримане у присутності випробовуваного зразка та у відсутності випробовуваного зразка – в контрольному досліді, який наведений в 4-5-2, повинне відрізнятись не більше ніж в 2 рази. При перевірці придатності методики з використанням методу MPN результат, розрахований для інокулуму, повинен знаходитись всередині 95 % довірчого інтервалу результату, отриманого в контрольному досліді.

Якщо для всіх наведених методів випробування виконання наведених вище критеріїв не може бути досягнуте для одного або більше тест-мікроорганізмів, для випробування лікарського засобу слід вибрати метод та умови випробування, що забезпечують якнайповніше виконання критеріїв придатності.

## 5. ВИПРОБУВАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 5-1. КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКА ДЛЯ ВИПРОБУВАННЯ

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, для випробування використовують зразки по 10 г або 10 мл лікарського засобу, відібрані з дотриманням застережних заходів, як наведено вище. Для ви-

пробування рідких або твердих лікарських засобів у формі аерозолів використовують 10 контейнерів. Для випробування трансдермальних пластирів використовують десять пластирів.

Кількість зразка для випробування може бути зменшена для активних субстанцій при виконанні наступних умов: кількість субстанції в одній дозованій одиниці (тобто таблетці, капсулі, ін'єкції) менше або дорівнює 1 мг або кількість субстанції в грамі або мілілітрі (для лікарських засобів не в дозованих формах) менше 1 мг. У цих випадках кількість зразка для випробування має бути не менше кількості, що припадає на 10 дозованих одиниць, або 10 г, або 10 мл лікарського засобу.

Для активних субстанцій із обмеженою кількістю зразка, обмеженим або дуже малим (менше 1000 мл або 1000 г) розміром партії кількість зразка для випробування повинна складати 1 % від партії, якщо менша кількість не зазначена в окремій статті.

Якщо загальна кількість одиниць лікарського засобу в партії менше 200 (наприклад, зразки для клінічних випробувань), кількість зразка для випробування може бути зменшена до 2 одиниць або 1 одиниці, якщо число одиниць в партії менше 100.

Зразки відбирають у випадковому порядку з упаковок in bulk або з контейнерів із готовим лікарським засобом. Якщо необхідно, при відборі однієї проби змішують вміст декількох контейнерів для того, щоб отримати зразок необхідної маси або об'єму.

## 5-2. ВИСІВАННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 5-2-1. Метод мембранної фільтрації

Використовують фільтраційну установку, конструкція якої дозволяє проводити перенесення мембранного фільтра на живильне середовище. Готують випробовуваний зразок, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4, переносять підхожу кількість зразка на кожен з 2 мембранних фільтрів та негайно фільтрують. Кожен мембранний фільтр відмивають, використовуючи процедуру, придатність якої була доведена раніше.

Для визначення ТАМС один мембранний фільтр поміщають на поверхню соєво-казеїнового агару. Для визначення ТУМС другий мембранний фільтр поміщають на поверхню Сабуро-декстрозного агару. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С від 5 до 7 діб. Розраховують число КУО в грамі або мілілітрі лікарського засобу.

При випробуванні трансдермальних пластирів по 10 % від об'єму зразка, підготовленого, як наведено в розділі 4-5-1, пропускають через кожен з двох

стерильних мембранних фільтрів. Для визначення ТАМС один мембранний фільтр поміщають на поверхню соєво-казеїнового агару. Для визначення ТУМС другий мембранний фільтр поміщають на поверхню Сабуро-декстрозного агару.

### 5-2-2. Методи висівання на чашки

#### 5-2-2-1. Метод глибинного висівання

Готують випробовуваний зразок, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. Для кожного розведення зразка готують не менше 2 чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С від 5 до 7 діб. Відбирають чашки, що відповідають одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищує 250 при визначенні ТАМС та 50 при визначенні ТУМС. Для кожного живильного середовища обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній та визначають число КУО в грамі або мілілітрі лікарського засобу.

#### 5-2-2-2. Метод поверхневого висівання

Готують випробовуваний зразок, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. Для кожного розведення зразка готують не менше 2 чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Інкубацію та визначення числа КУО проводять як наведено для методу глибинного висівання.

#### 5-2-3. Метод найбільш імовірного числа

Готують випробовуваний зразок та його розведення, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. Всі пробірки інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб. При необхідності проводять пересівання, використовуючи процедуру, придатність якої доведена. Для кожного розведення відзначають кількість пробірок, в яких спостерігається зростання мікроорганізмів. Визначають найбільш імовірне число мікроорганізмів в грамі або мілілітрі випробовуваного лікарського засобу за Табл. 2.6.12.-3.

## 5-3. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) приймають число КУО, розраховане для соєво-казеїнового агару; якщо на цьому середовищі виявлені колонії грибів, їх враховують при визначенні ТАМС. За загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) приймають число КУО, розраховане для Сабуро-декстрозного агару; якщо на цьому середовищі виявлені колонії бактерій, їх враховують при визначенні ТУМС. Якщо очікується, що у зв'язку з наявністю зростання бактерій значення ТУМС буде перевищувати критерій прийнятності,

## 2.6. Біологічні випробування

для проведення випробування може бути використаний Сабуро-декстрозний агар, що містить антибіотик. При використанні методу MPN розраховане значення відповідає ТАМС.

Якщо критерії прийнятності мікробіологічної чистоти визначені в окремій статті, результати інтерпретують наступним чином:

- $10^1$  КУО максимально допустиме число = 20;
- $10^2$  КУО максимально допустиме число = 200;
- $10^3$  КУО максимально допустиме число = 2000 і т.д.

Рекомендовані розчини та живильні середовища наведені в статті 2.6.13.

N

Національна частина статті містить уточнення та доповнення тексту Європейської Фармакопеї, а також опис методу двошарового висівання.

### 4. РОСТОВІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ПІДРАХУНКУ ТА НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

#### 4-2. ПІДГОТОВКА ТЕСТ-МІКРООРГАНІЗМІВ

Для перевірки придатності методик та перевірки ростових та інгібіторних властивостей живильних середовищ як альтернативні можуть бути використані наступні тест-мікроорганізми:

- замість *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594 може бути використаний тест-мікроорганізм *Candida albicans* УКМ Y-1918 (ATCC 885-653, ГИСК 259).

#### 4-5. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ПІДРАХУНКУ У ПРИСУТНОСТІ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

##### 4-5-1. Підготовка зразка

*Лікарські засоби, що містять жири.* Лікарський засіб розчиняють в ізопропілміристіаті, стерилізованому шляхом фільтрації (або в автоклаві з використанням валідованого циклу стерилізації), або змішують з мінімально необхідною кількістю стерильного полісорбату-80 або іншої стерильної поверхнево-активної речовини, що не володіє антимікробною дією. При необхідності поверхнево-активну речовину підігрівають до температури не більше 40 °С, у виняткових випадках допускається підігрівання до температури не більше 45 °С. Ретельно перемішують, при необхідності підтримуючи температуру на водяній бані. Додають необхідну кількість

заздалегідь підігрітого вибраного розчинника для отримання необхідного розведення випробовуваного лікарського засобу. Ретельно перемішують, підтримуючи температуру, протягом мінімального часу, необхідного для утворення емульсії. Подальші десятиразові розведення зразка можуть бути приготовані за допомогою того ж вибраного розчинника, що містить відповідну концентрацію стерильного полісорбату-80 або іншої стерильної поверхнево-активної речовини, що не володіє антимікробною дією.

**4-5-2. Інокуляція та розбавлення.** До зразка лікарського засобу, підготовленого, як наведено вище (4-5-1), та до контрольного зразка (що не містить випробовуваного лікарського засобу) додають відповідний об'єм суспензії тест-мікроорганізму. Об'єм інокуляту не повинен перевищувати 1 % об'єму зразка. При використанні методу мембранної фільтрації та методу висівання на чашки об'єм інокуляту має бути таким, щоб забезпечити наявність від 10 до 100 КУО на одній чашці або мембранному фільтрі. При використанні методу найбільш імовірного числа інокуляцію здійснюють так, щоб найменше розведення зразка містило від 10 КУО до 100 КУО в 1 мл.

При перевірці придатності методики здійснюють інокуляцію підготовленого зразка в найменшому з можливих розведень. У разі, коли не вдається уникнути пригнічення зростання тест-мікроорганізмів під впливом зразка, допускається додавати суспензію мікроорганізмів після нейтралізації, розбавлення або фільтрації.

**4-5-3. Нейтралізація/усунення антимікробної активності.** Відповідно до процедури, наведеної в 4-5-4, проводять визначення числа мікроорганізмів в зразку, підготовленому, як наведено в 4-5-2, та порівнюють отримане значення з числом мікроорганізмів в контрольному досліді.

Якщо спостерігається пригнічення зростання тест-мікроорганізмів (невідповідність критеріям придатності, які наведені в розділі 4-6), з метою отримання вірогідних результатів випробування необхідно внести зміни в окрему методику визначення числа мікроорганізмів. Зміни методики можуть включати, наприклад: (1) збільшення об'єму розчинника або живильного середовища, (2) додавання до розчинника та/або живильного середовища специфічних або неспецифічних інактиваторів, (3) використання методу мембранної фільтрації або (4) комбінацію наведених вище прийомів.

**4-5-4. Виявлення мікроорганізмів у присутності випробовуваного лікарського засобу.** Проводять окреме випробування для кожного з перерахованих в даній статті тест-мікроорганізмів. Проводять підрахунок тільки тест-мікроорганізму, який використовувався як інокулят.

**4-5-4-2. Метод висівання на чашки.** При випробуванні методом висівання на чашки використовують

не менше двох чашок з кожним живильним середовищем та результат визначають як середнє арифметичне значення числа колоній, що виростили на всіх паралельних чашках.

#### 4-5-4-2-3. Метод двошарового висівання

У чашки Петрі діаметром 9 см вносять від 15 мл до 20 мл соєво-казеїнового агару або Сабуро-декстрозного агару з температурою від 45 °С до 50 °С та дають середовищу застигнути. При використанні чашок Петрі більшого діаметра відповідно збільшують об'єм живильного середовища. 1 мл випробовуваного зразка, підготовленого, як наведено в розділах з 4-5-1 по 4-5-3, вносять до пробірки, що містить близько 4 мл того самого розплавленого та охолодженого до температури не більше 45 °С густого живильного середовища. Швидко перемішують вміст пробірки та переносять в чашку Петрі, підготовлену, як наведено вище. Швидким похитуванням чашки Петрі рівномірно розподіляють верхній шар живильного середовища. Для кожного з тест-мікроорганізмів, наведених в Табл. 2.6.12.-1, використовують не менше двох чашок Петрі. Інкують посіви, як вказано в Табл. 2.6.12.-1. Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній тест-мікроорганізму на живильному середовищі та визначають число КУО у вихідному інокулі.

## 5. ВИПРОБУВАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 5-2. ВИСІВАННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

#### 5-2-1. Метод мембранної фільтрації

Використовують фільтраційну установку, конструкція якої дозволяє проводити перенесення мембранного фільтра на живильне середовище. Готують випробовуваний зразок, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4, переносять підходящу кількість зразка на кожен з 2 мембранних фільтрів та негайно фільтрують. При необхідності кожен мембранний фільтр відмивають, використовуючи процедуру, придатність якої була доведена раніше.

Для визначення ТАМС один мембранний фільтр поміщають на поверхню соєво-казеїнового агару. Для визначення ТУМС другий мембранний фільтр поміщають на поверхню Сабуро-декстрозного агару. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкують при температурі від 20 °С до 25 °С від 5 до 7 діб. Розраховують число КУО в грамі або мілілітрі лікарського засобу.

При випробуванні трансдермальних пластирів по 10 % від об'єму зразка, підготовленого, як наведено в розділі 4-5-1, пропускають через кожен з двох стерильних мембранних фільтрів. Для визначення

ТАМС один мембранний фільтр поміщають на поверхню соєво-казеїнового агару. Для визначення ТУМС другий мембранний фільтр поміщають на поверхню Сабуро-декстрозного агару.

#### 5-2-2. Методи висівання на чашки

##### 5-2-2-1. Метод глибинного висівання

Готують випробовуваний зразок та, при необхідності, його розведення, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. По 1 мл підготовленого зразка та/або, при необхідності, його розведень висівають на чашки Петрі з соєво-казеїновим або Сабуро-декстрозним агаром, як наведено в розділі 4-5-4-2-1. Для кожного розведення зразка готують не менше 2 чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкують при температурі від 20 °С до 25 °С від 5 до 7 діб. Відбирають чашки, що відповідають одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищує 250 при визначенні ТАМС та 50 при визначенні ТУМС. Для кожного живильного середовища обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній та визначають число КУО в грамі або мілілітрі лікарського засобу.

##### 5-2-2-2. Метод поверхневого висівання

Готують випробовуваний зразок та, при необхідності, його розведення, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. Точно відміряний об'єм, встановлений, як наведено в розділі 4, висівають на чашки Петрі з соєво-казеїновим або Сабуро-декстрозним агаром, як наведено в розділі 4-5-4-2-2. Для кожного розведення зразка готують не менше 2 чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Інкубацію та визначення числа КУО проводять як наведено для методу глибинного висівання.

##### 5-2-2-3. Метод двошарового висівання

Готують випробовуваний зразок та, при необхідності, його розведення, використовуючи методику, придатність якої була доведена, як наведено в розділі 4. По 1 мл підготовленого зразка та/або, при необхідності, його розведень висівають на чашки Петрі з соєво-казеїновим або Сабуро-декстрозним агаром, як наведено в розділі 4-5-4-2-3. Для кожного розведення зразка готують не менше 2 чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Інкубацію та визначення числа КУО проводять, як наведено для методу глибинного висівання. ▀



## 2.6. Біологічні випробування

### 2.6.13. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ: ВИПРОБУВАННЯ НА ОКРЕМІ ВИДИ МІКРООРГАНІЗМІВ

#### 1. ВСТУП

Випробування, наведені нижче, дозволяють встановити відсутність або обмежену наявність окремих видів мікроорганізмів, які можуть бути виявлені в наведених умовах.

Випробування призначені перш за все для того, щоб визначити, чи відповідає субстанція або готовий лікарський засіб встановленим вимогам щодо мікробіологічної чистоти. Якщо випробування використовують з цією метою, виконують вказівки, наведені нижче, включаючи число зразків, що відбирають для випробування, та інтерпретацію отриманих результатів.

Допускається використання альтернативних мікробіологічних методів, включаючи автоматизовані, за умови, що доведена їх еквівалентність методу, наведеному у Фармакопеї.

#### 2. ЗАГАЛЬНІ ПРОЦЕДУРИ

Підготовку зразків проводять, як наведено в статті (2.6.12).

Якщо випробовуваний лікарський засіб володіє антимікробною дією, вона має бути, наскільки це можливо, усунена або нейтралізована, як наведено в статті (2.6.12).

Якщо для підготовки зразка використовують поверхнево-активні речовини, слід довести їх нешкідливість для мікроорганізмів та сумісність з використовуваними інактиваторами, як наведено в статті (2.6.12).

#### 3. РОСТОВІ ТА ІНГІБІТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ТА НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

Слід підтвердити здатність методики забезпечувати виявлення мікроорганізмів у присутності випробовуваного зразка. Придатність методики слід підтверджувати, якщо в процедуру випробування або в лікарський засіб вносять зміни, здатні вплинути на результати випробування.

##### 3-1. ПІДГОТОВКА ТЕСТ-МІКРООРГАНІЗМІВ

Використовують стандартизовані стабільні суспензії тест-мікроорганізмів або готують їх, як наведено нижче. Пересівання тест-мікроорганізмів проводять так, щоб життєздатні мікроорганізми, які викорис-

товують для інокуляції, були отримані за допомогою не більше як 5 пасажів від вихідного тест-штаму.

**3-1-1. Аеробні мікроорганізми.** Тест-штами бактерій вирощують, кожен окремо, на соєво-казеїновому бульйоні або соєво-казеїновому агарі при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год. Тест-штам *Candida albicans* вирощують на Сабуро-декстрозному агарі або на Сабуро-декстрозному бульйоні при температурі від 20 °С до 25 °С від 2 діб до 3 діб.

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 або NBRC 13276;

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 або NBRC 13275;

*Escherichia coli* ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 або NBRC 3972;

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028 або як альтернатива *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* NBRC 100797, NCTC 6017 або CIP 80.39;

*Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 або NBRC 1594.

Для приготування робочих суспензій тест-мікроорганізмів використовують буферний розчин з натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 або фосфатний буферний розчин рН 7.2. Робочі суспензії слід використовувати протягом 2 год або протягом 24 год, якщо їх зберігають при температурі від 2 °С до 8 °С.

**3-1-2. Clostridia.** Використовують *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651), або ATCC 19404 (NCTC 532 або CIP 79.03), або NBRC 14293. Тест-мікроорганізм вирощують в анаеробних умовах на збагаченому середовищі для клостридій при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год. Для інокуляції може бути використана свіжоприготовлена і розведена суспензія вегетативних клітин *C. sporogenes* або стабільна суспензія спор. Стабільну суспензію спор зберігають при температурі від 2 °С до 8 °С протягом часу, встановленого при валідації.

##### 3-2. НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

Для контролю умов випробування проводять негативний контрольний дослід, використовуючи вибраний розчинник замість випробовуваного зразка. Зростання мікроорганізмів має бути відсутнім. Негативний контрольний дослід проводять також при випробуванні лікарських засобів, як наведено в розділі 4. Слід встановлювати причини незадовільного негативного контрольного дослідження.

##### 3-3. РОСТОВІ ТА ІНГІБІТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Проводять перевірку кожної партії готового до використання живильного середовища та кожної пар-

тій середовища, приготованого з сухого середовища або окремих інгредієнтів.

Перевірку відповідних властивостей живильних середовищ проводять відповідно до Табл. 2.6.13.-1.

**Випробування ростових властивостей рідких живильних середовищ.** Порцію живильного середовища інокулюють невеликою кількістю (не більше 100 КУО) відповідного тест-мікроорганізму. Інкують при відповідній температурі не більше найменшого часу інкубації, вказаного в методиці випробування. Повинне спостерігатися виразно видиме зростання тест-мікроорганізмів, що не поступається за інтенсивністю зростанню в раніше перевіреній та визнаній придатною партії середовища.

**Випробування ростових властивостей густих живильних середовищ.** Чашки з живильним середовищем інокулюють, використовуючи метод поверхневого висівання, невеликою кількістю (не більше 100 КУО) відповідного тест-мікроорганізму. Інкують при відповідній температурі не більше найменшого часу інкубації, вказаного в методиці випробування. Повинне спостерігатися виразно видиме зростання тест-мікроорганізму, що не поступається за інтенсивністю зростанню на раніше перевіреній та визнаній придатною партії середовища.

**Випробування інгібіторних властивостей рідких або густих живильних середовищ.** Живильне середовище інокулюють відповідним тест-мікроорганізмом (не менше 100 КУО). Інкують при відповідній

температурі не менше найбільшого часу інкубації, вказаного в методиці випробування. Зростання тест-мікроорганізму має бути відсутнє.

**Випробування індикативних властивостей:** чашки з живильним середовищем інокулюють, використовуючи метод поверхневого висівання, невеликою кількістю (не більше 100 КУО) відповідного тест-мікроорганізму. Інкують при відповідній температурі протягом часу, вказаного в методиці випробування. Повинне спостерігатися зростання колоній, відповідних на вигляд та за індикативними реакціями колоніям на раніше перевіреній та визнаній придатною партії середовища.

### 3-4. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ВИПРОБУВАННЯ

Для кожного випробовуваного лікарського засобу готують зразок, як наведено у відповідному пункті розділу 4. Вносять зразок до живильного середовища та у момент перемішування додають монокультуру одного з тест-мікроорганізмів. Число тест-мікроорганізмів в інокульованому зразку повинне складати не більше 100 КУО.

Проводять випробування, як наведено у відповідному пункті розділу 4, використовуючи найменший із вказаних періодів інкубації.

Окремі види мікроорганізмів повинні виявлятися за допомогою індикативних тестів, наведених в розділі 4.

Таблиця 2.6.13.-1

Ростові, інгібіторні та індикативні властивості живильних середовищ

	Живильне середовище	Властивості	Тест-мікроорганізми
Випробування на наявність толерантних до жовчі грамнегативних бактерій	Нагромаджувальний бульйон Мозеля для ентеробактерій	Ростові	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
		Інгібіторні	<i>S. aureus</i>
	Агар із глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним	Ростові та індикативні	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Випробування на наявність <i>Escherichia coli</i>	Бульйон Мак-Конки	Ростові	<i>E. coli</i>
		Інгібіторні	<i>S. aureus</i>
	Агар Мак-Конки	Ростові та індикативні	<i>E. coli</i>
Випробування на наявність <i>Salmonella</i>	Нагромаджувальний бульйон Раппапорта Вассиліадіса для <i>Salmonella</i>	Ростові	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> або <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i>
		Інгібіторні	<i>S. aureus</i>
	Дезоксихолатний агар із ксилізою та лізином	Ростові та індикативні	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> або <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i>
Випробування на наявність <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Цетримідний агар	Ростові	<i>P. aeruginosa</i>
		Інгібіторні	<i>E. coli</i>
Випробування на наявність <i>Staphylococcus aureus</i>	Манітно-сольовий агар	Ростові та індикативні	<i>S. aureus</i>
		Інгібіторні	<i>E. coli</i>
Випробування на наявність <i>Clostridia</i>	Збагачене середовище для клостридій	Ростові	<i>Ct. sporogenes</i>
	Колумбійський агар	Ростові	<i>Ct. sporogenes</i>
Випробування на наявність <i>Candida albicans</i>	Сабуро-декстрозний бульйон	Ростові	<i>C. albicans</i>
	Сабуро-декстрозний агар	Ростові та індикативні	<i>C. albicans</i>

## 2.6. Біологічні випробування

За наявності антимікробної дії випробовуваного лікарського засобу слід внести зміни в методику випробування (див. пункт 4-5-3 статті 2.6.12).

Якщо в умовах випробування на наявність мікроорганізму антимікробна активність лікарського засобу по відношенню щодо даного тест-мікроорганізму не може бути нейтралізована, то вважають, що цей мікроорганізм не присутній в лікарському засобі.

### 4. ВИПРОБУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

#### 4.1. ТОЛЕРАНТНІ ДО ЖОВЧІ ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ

4-1-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12), але як розчинник використовують соєво-казеїновий бульйон. Перемішують та інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С протягом часу, достатнього для відновлення життєздатності бактерій, але недостатнього для значного збільшення їх числа (від 2 год до 5 год).

4-1-2. Виявлення мікроорганізмів. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, об'єм зразка, підготовленого як наведено в пункті 4-1-1, що відповідає 1 г лікарського засобу, вносять у нагромаджувальний бульйон Мозеля для ентеробактерій. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год. Після закінчення періоду інкубації роблять пересівання на чашки з агаром із жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на чашках відсутнє зростання колоній.

#### 4-1-3. Кількісна оцінка

4-1-3-1. Відбір матеріалу та пересівання. Зразок, підготовлений, як наведено в пункті 4-1-1, та/або його розведення, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г та 0.001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл та 0.001 мл) випробовуваного лікарського засобу, переносять в контейнери, що містять відповідні об'єми нагромаджувального бульйону Мозеля для ентеробактерій. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год. З кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару з жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-1-3-2. Інтерпретація результатів. Зростання колоній на поверхні агару з жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним вказує на позитивний результат випробування. Відзначають найменшу кількість лікарського засобу, яка дає позитивний результат, та найбільшу кількість, яка дає негативний результат. Імовірне число бактерій визначають за Табл. 2.6.13.-2.

Таблиця 2.6.13.-2

#### Інтерпретація результатів

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу			Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	
+	+	+	більше 10 <sup>3</sup>
+	+	-	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	-	-	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
-	-	-	менше 10

#### 4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-2-2. Відбір матеріалу та пересівання. Струшують контейнер, переносять 1 мл соєво-казеїнового бульйону в 100 мл бульйону Мак-Конки. Інкують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. Проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-2-3. Інтерпретація результатів. Зростання колоній вказує на можливу присутність *E. coli*, що підтверджують тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо відсутнє зростання колоній на агарі Мак-Конки або тести ідентифікації дали негативний результат.

#### 4-3. *SALMONELLA*

4-3-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок, як наведено в статті (2.6.12) та вносять його об'єм, що відповідає не менше ніж 10 г або 10 мл випробовуваного лікарського засобу, у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-3-2. Відбір матеріалу та пересівання. Переносять 0.1 мл соєво-казеїнового бульйону в 10 мл нагромаджувального бульйону Рапппорта Василіадіса для *Salmonella*. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год. Проводять пересівання на поверхню дезоксихолатного агару з ксилізою та лізином. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 48 год.

4-3-3. **Інтерпретація результатів.** Зростання добре розвинених червоних колоній із чорними центрами або без них свідчить про можливість наявності *Salmonella* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації дали негативний результат.

#### 4-4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4-4-1. **Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують. При випробуванні трансдермальних пластирів об'єм зразка, підготовленого, як наведено в пункті 4-5-1 статті (2.6.12), що відповідає 1 пластиру, пропускають через стерильний мембранний фільтр. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл соєво-казеїнового бульйону. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-4-2. **Відбір матеріалу та пересівання.** Проводять пересівання на поверхню цетримідного агару та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-4-3. **Інтерпретація результатів.** Зростання колоній свідчить про можливість наявності *P. aeruginosa* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні цетримідного агару відсутнє зростання колоній або тести ідентифікації дали негативний результат.

#### 4-5. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4-5-1. **Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують. При випробуванні трансдермальних пластирів об'єм зразка, підготовленого, як наведено в пункті 4-5-1 статті (2.6.12), що відповідає 1 пластиру, пропускають через стерильний мембранний фільтр. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл соєво-казеїнового бульйону. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-5-2. **Відбір матеріалу та пересівання.** Проводять пересівання на поверхню манітно-сольового агару

та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-5-3. **Інтерпретація результатів.** Зростання жовтих або білих колоній, оточених жовтою зоною, свідчить про можливість наявності *S. aureus* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні манітно-сольового агару відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації дали негативний результат.

#### 4-6. *CLOSTRIDIA*

4-6-1. **Підготовка зразка та термічна обробка.** Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 2 г або 2 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12) (об'єм зразка повинен складати не менше 20 мл). Зразок розподіляють на 2 порції, не менше 10 мл кожна. Одну порцію прогрівають при температурі 80 °С протягом 10 хв та швидко охолоджують. Другу порцію не прогрівають.

4-6-2. **Відбір матеріалу та пересівання.** По 10 мл (або об'єм, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу) від кожної порції вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) збагаченого середовища для клостридій. Інкують в анаеробних умовах при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 48 год. Після закінчення інкубації з кожного контейнера проводять пересівання на поверхню колумбійського агару та інкують в анаеробних умовах при температурі від 30 °С до 35 °С від 48 год до 72 год.

4-6-3. **Інтерпретація результатів.** Наявність в анаеробних умовах зростання паличок (із ендоспорами або без них), що дають негативну реакцію на каталазу, вказує на присутність клостридій, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні колумбійського агару відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації дали негативний результат.

#### 4-7. *CANDIDA ALBICANS*

4-7-1. **Підготовка зразка та попередня інкубація.** 10 мл випробовуваного зразка, підготовленого, як наведено в статті (2.6.12), або його кількість, що відповідає не менше ніж 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у 100 мл Сабуро-декстрозного бульйону та перемішують. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 3 до 5 діб.

4-7-2. **Відбір матеріалу та пересівання.** Проводять пересівання на поверхню Сабуро-декстрозного агару та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год.

## 2.6. Біологічні випробування

4-7-3. **Інтерпретація результатів.** Зростання білих колоній свідчить про можливість наявності *S. albicans* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні Сабуро-декстрозного агару відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації дали негативний результат.

*Наведений нижче розділ має інформаційний характер*

### 5. РЕКОМЕНДОВАНІ РОЗЧИНИ ТА ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Наведені нижче розчини та живильні середовища дають задовільні результати при визначенні мікробіологічної чистоти відповідно до Фармакопеї. Допускається використання інших живильних середовищ за умови доказу їх придатності.

**Основний буферний розчин.** 34 г калію дигідрофосфату поміщають в мірну колбу об'ємом 1000 мл, розчиняють в 500 мл води очищеної, доводять значення рН до  $7.2 \pm 0.2$  за допомогою натрію гідроксиду, доводять об'єм до 1000 мл водою очищеною та перемішують. Розливають у контейнери та стерилізують. Зберігають при температурі від  $2^\circ\text{C}$  до  $8^\circ\text{C}$ .

**Фосфатний буферний розчин рН 7.2.** Змішують основний буферний розчин з водою очищеною (1:800 об/об) та стерилізують.

#### Буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном рН 7.0

Калію дигідрофосфат	3.6 г
Динатрію гідрофосфат дигідрат	7.2 г еквівалент 0.067 М фосфату
Натрію хлорид	4.3 г
Пептон (м'ясний або казеїновий)	1.0 г
Вода очищена	1000 мл

Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Соево-казеїновий бульйон

Панкреатичний гідролізат казеїну	17.0 г
Папаїновий гідролізат соєвих бобів	3.0 г
Натрію хлорид	5.0 г
Дикалію гідрофосфат	2.5 г
Глюкози моногідрат	2.5 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.3 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Соево-казеїновий агар

Панкреатичний гідролізат казеїну	15.0 г
Папаїновий гідролізат соєвих бобів	5.0 г

Натрію хлорид	5.0 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.3 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Сабуро-декстрозний агар

Декстроза	40.0 г
Суміш пептичного гідролізату тваринних тканин та панкреатичного гідролізату казеїну (1:1)	10.0 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $5.6 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Картопляно-декстрозний агар

Витяжка з картоплі	200 г
Декстроза	20.0 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $5.6 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Сабуро-декстрозний бульйон

Декстроза	20.0 г
Суміш пептичного гідролізату тваринних тканин та панкреатичного гідролізату казеїну (1:1)	10.0 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $5.6 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Нагромаджувальний бульйон Мозеля для ентробактерій

Панкреатичний гідролізат желатину	10.0 г
Глюкози моногідрат	5.0 г
Бичача жовч зневоднена	20.0 г
Калію дигідрофосфат	2.0 г
Динатрію гідрофосфат дигідрат	8.0 г
Діамантовий зелений	15 мг
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після нагрівання його значення становило  $7.2 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Нагрівають при температурі  $100^\circ\text{C}$  протягом 30 хв та негайно охолоджують.

#### Агар із жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним

Дріжджовий екстракт	3.0 г
Панкреатичний гідролізат желатину	7.0 г

Солі жовчних кислот	1.5 г
Натрію хлорид	5.0 г
Глюкози моногідрат	10.0 г
Агар	15.0 г
Нейтральний червоний	30 мг
Кристалічний фіолетовий	2 мг
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після нагрівання його значення становило  $7.4 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Нагрівають до кипіння; нагрівання в автоклаві не допускається.

#### Бульйон Мак-Конки

Панкреатичний гідролізат желатину	20.0 г
Лактози моногідрат	10.0 г
Бичача жовч зневоднена	5.0 г
Бромкрезоловий пурпуровий	10 мг
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.3 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Агар Мак-Конки

Панкреатичний гідролізат желатину	17.0 г
Пептони (м'ясний та казеїновий)	3.0 г
Лактози моногідрат	10.0 г
Натрію хлорид	5.0 г
Солі жовчних кислот	1.5 г
Агар	13.5 г
Нейтральний червоний	30.0 мл
Кристалічний фіолетовий	1 мл
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.1 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Кип'ять протягом 1 хв при постійному перемішуванні, потім стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Нагромаджувальний бульйон Раппапорта Василадіса для *Salmonella*

Соевий пептон	4.5 г
Магнію хлорид гексагідрат	29.0 г
Натрію хлорид	8.0 г
Дикалію фосфат	0.4 г
Калію дигідрофосфат	0.6 г
Малахітовий зелений	0.036 г
Вода очищена	1000 мл

Інгредієнти складу розчиняють при акуратному нагріванні. Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації, при температурі не вище  $115^\circ\text{C}$ . Після нагрівання та стерилізації значення рН повинне складати  $5.2 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ .

#### Дезоксихолатний агар з ксилозою та лізином

Ксилоза	3.5 г
L-лізин	5.0 г

Лактози моногідрат	7.5 г
Сахароза	7.5 г
Натрію хлорид	5.0 г
Дріжджовий екстракт	3.0 г
Феноловий червоний	80 мг
Агар	13.5 г
Натрію дезоксихолат	2.5 г
Натрію тіосульфат	6.8 г
Заліза (III) амонію цитрат	0.8 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після нагрівання його значення становило  $7.4 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Нагрівають до моменту закипання. Охолоджують до температури  $50^\circ\text{C}$  та розливають в чашки Петрі. Нагрівання в автоклаві не допускається.

#### Цетримідний агар

Панкреатичний гідролізат желатину	20.0 г
Магнію хлорид	1.4 г
Дикалію сульфат	10.0 г
Цетримід	0.3 г
Агар	13.6 г
Вода очищена	1000 мл
Гліцерин	10.0 мл

Нагрівають до кипіння та кип'ять протягом 1 хв при перемішуванні. Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.2 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Манітно-сольовий агар

Панкреатичний гідролізат казеїну	5.0 г
Пептичний гідролізат тваринних тканин	5.0 г
Яловичий екстракт	1.0 г
D-маніт	10.0 г
Натрію хлорид	75.0 г
Агар	15.0 г
Феноловий червоний	0.025 г
Вода очищена	1000 мл

Нагрівають до кипіння та кип'ять протягом 1 хв при перемішуванні. Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.4 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

#### Збагачене середовище для клостридій

Яловичий екстракт	10.0 г
Пептон	10.0 г
Дріжджовий екстракт	3.0 г
Розчинний крохмаль	1.0 г
Глюкози моногідрат	5.0 г
Цистеїну гідрохлорид	0.5 г
Натрію хлорид	5.0 г
Натрію ацетат	3.0 г
Агар	0.5 г
Вода очищена	1000 мл

## 2.6. Біологічні випробування

Замочують агар та розчиняють його, нагріваючи до кипіння при безперервному перемішуванні. При необхідності встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило близько  $6.8 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

### Колумбійський агар

Панкреатичний гідролізат казеїну	10.0 г
Пептичний гідролізат м'яса	5.0 г
Панкреатичний гідролізат серця	3.0 г
Дріжджовий екстракт	5.0 г
Кукурудзяний крохмаль	1.0 г
Натрію хлорид	5.0 г
Агар (відповідно до гелеутворюючих властивостей)	від 10.0 г до 15.0 г
Вода очищена	1000 мл

Замочують агар та розчиняють його, нагріваючи до кипіння при безперервному перемішуванні. При необхідності встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.3 \pm 0.2$  при температурі  $25^\circ\text{C}$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації. Дають охолонути до температури від  $45^\circ\text{C}$  до  $50^\circ\text{C}$ , додають, якщо необхідно, 20 мг гентаміцину сульфату в перерахунку на гентаміцину основу, та розливають в чашки Петрі.

N

Національна частина статті містить уточнення та доповнення тексту Європейської Фармакопеї, а також опис деяких біохімічних тестів, необхідних для ідентифікації окремих видів мікроорганізмів.

### 3. РОСТОВІ ТА ІНГІБІТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ТА НЕГАТИВНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ДОСЛІД

3-1-1. Аеробні мікроорганізми. Для перевірки придатності методик та перевірки ростових та інгібіторних властивостей живильних середовищ як альтернативні можуть бути використані наступні тест-мікроорганізми:

- замість *Escherichia coli* ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 або NBRC 3972 може бути використаний тест-мікроорганізм *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922);
- замість *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594 може бути використаний тест-мікроорганізм *Candida albicans* УКМУ-1918 (ATCC 885-653, ГИСК 259).

3-1-2. Clostridia. Як альтернативний замість тест-мікроорганізму *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651), або ATCC 19404 (NCTC 532 або CIP 79.03), або NBRC

14293 може бути використаний тест-мікроорганізм *Clostridium sporogenes* ГИСК 272.

### 3-4. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ВИПРОБУВАННЯ

Якщо в умовах випробування наявність мікроорганізму антимікробна активність лікарського засобу по відношенню щодо відповідного тест-мікроорганізму не може бути нейтралізована, то вважають, що проведення даного випробування недоцільне.

## 4. ВИПРОБУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

### 4.1. ТОЛЕРАНТНІ ДО ЖОВЧІ ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ

4-1-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок у розведенні 1:10 (або в іншому розведенні, визначеному як наведено в розділі 3-4), використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в загальній (2.6.12), але як розчинник використовують соєво-казеїновий бульйон. Перемішують та інкубують при температурі від  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$  протягом часу, достатнього для відновлення життєздатності бактерій, але не достатнього для значного збільшення їх числа (від 2 год до 5 год).

4-1-2. Виявлення мікроорганізмів. Якщо немає інших зазначень в окремій статті об'єм зразка, підготовленого як наведено в пункті 4-1-1, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений як наведено в розділі 3-4) нагромаджувального бульйону Мозеля для ентеробактерій. Інкують при температурі від  $30^\circ\text{C}$  до  $35^\circ\text{C}$  від 24 год до 48 год. Після закінчення періоду інкубації роблять пересівання на чашки з агаром із жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інкують при температурі від  $30^\circ\text{C}$  до  $35^\circ\text{C}$  від 18 год до 24 год.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на чашках відсутнє зростання колоній.

### 4-1-3. Кількісна оцінка

4-1-3-1. Відбір матеріалу та пересівання. Зразок, підготовлений, як наведено в пункті 4-1-1, та/або його розведення, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г та 0.001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл та 0.001 мл) випробовуваного лікарського засобу, переносять в контейнери, що містять відповідні об'єми нагромаджувального бульйону Мозеля для ентеробактерій (як правило, використовують 10 мл бульйону Мозеля або інший об'єм, визначений, як наведено в розділі 3-4). Інкують при температурі від  $30^\circ\text{C}$  до  $35^\circ\text{C}$  від 24 год до 48 год. З кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інку-

бують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-1-3-2. *Інтерпретація результатів.* Зростання колоній на поверхні агару з жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним указує на позитивний результат випробування. Відсутність колоній на поверхні агару з жовцю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним указує на негативний результат випробування.

Імовірне число бактерій визначають за Табл. 2.6.13.-3 із урахуванням результатів, отриманих для кожної кількості лікарського засобу.

Таблиця 2.6.13.-3

*Інтерпретація результатів*

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу			Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	
+	+	+	більше 10 <sup>3</sup>
+	+	—	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	—	—	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
—	—	—	менше 10

Умовні позначення:

«+» — позитивний результат випробування;

«—» — негативний результат випробування.

4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. *Підготовка зразка та попередня інкубація.* Готують зразок у розведенні 1:10 (або в іншому розведенні, визначеному, як наведено в розділі 3-4), використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). При випробуванні методом прямого висівання 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують.

При випробуванні методом мембранної фільтрації 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При необхідності мембранний фільтр відмивають, використовуючи підхожу кількість промивної рідини. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл або інший об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону.

Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-2-2. *Відбір матеріалу та пересівання.* Струшують контейнер, переносять 1 мл соєво-казеїнового бульйону в 10 мл бульйону Мак-Конки. Інкубують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. Проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки

та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-2-3. *Інтерпретація результатів.* Зростання на поверхні агару Мак-Конки червоних колоній грамнегативних паличок указує на можливу присутність *E. coli* в лікарському засобі, що підтверджують тестами ідентифікації, наприклад тестами на наявність ферменту цитохромоксидази, утилізацію цитрату та утворення індолу. *E. coli* дає негативну реакцію на цитохромоксидазу та утилізацію цитрату, позитивну реакцію на індол.

Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо відсутнє зростання колоній на агарі Мак-Конки або тести ідентифікації не підтвердили наявності *E. coli*.

4-3. *SALMONELLA*

4-3-1. *Підготовка зразка та попередня інкубація.* 10 г або 10 мл випробовуваного лікарського засобу вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують. Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-3-2. *Відбір матеріалу та пересівання.* Переносять 0.1 мл соєво-казеїнового бульйону в 10 мл нагромаджувального бульйону Раппапорта Василадіса для *Salmonella*. Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год. Проводять пересівання на поверхню дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином. Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 48 год.

4-3-3. *Інтерпретація результатів.* Зростання добре розвинених червоних колоній (з чорними центрами або без них) грамнегативних паличок свідчить про можливість наявності *Salmonella* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестом на наявність ферменту цитохромоксидази та тестом на утилізацію глюкози, лактози та утворення сірководню з використанням трицукрового агару з залізом. *Salmonella* дає негативну реакцію на цитохромоксидазу. Зростання *Salmonella* на трицукровому агарі з залізом викликає зміну кольору середовища з червоного в жовтий в глибині агару, але не на його поверхні (позитивна реакція на утилізацію глюкози та негативна реакція на утилізацію лактози); наявність чорного забарвлення свідчить про утворення сірководню. Могуть бути використані додаткові серологічні тести.

Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином відсутнє зростання колоній, наведених вище.



## 2.6. Біологічні випробування

або тести ідентифікації не підтвердили наявності *Salmonella*.

### 4-4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4-4-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок в розведенні 1:10 (або в іншому розведенні, визначеному, як наведено в розділі 3-4), використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). При випробуванні методом прямого висівання 10 мл підготовленого зразка або його кількість, відповідну 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять до відповідного об'єму (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують.

При випробуванні методом мембранної фільтрації 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При випробуванні трансдермальних пластирів об'єм зразка, підготовленого, як наведено в пункті 4-5-1 статті (2.6.12), що відповідає 1 пластиру, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При необхідності мембранний фільтр відмивають, використовуючи піджоху кількість промивної рідини. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл або інший відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону.

Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-4-2. Відбір матеріалу та пересівання. Проводять пересівання на поверхню цетримідного агару та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-4-3. Інтерпретація результатів. Зростання, як правило, зеленуватих колоній грамнегативних паличок свідчить про можливість наявності *P. aeruginosa* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестом на наявність ферменту цитохромоксидази та тестами утворення пігментів піоціаніну та флуоресцину з використанням відповідних густих живильних середовищ. *P. aeruginosa* дає позитивну реакцію на цитохромоксидазу. На поверхні густого живильного середовища для виявлення піоціаніну *P. aeruginosa* утворює, як правило, зеленуваті колонії, блакитні в ультрафіолетовому світлі, що свідчить про наявність пігменту піоціаніну. На поверхні густого живильного середовища для виявлення флуоресцину *P. aeruginosa* утворює, як правило, безбарвні або жовтуваті колонії, жовтуваті в ультрафіолетовому світлі, що свідчить про наявність пігменту флуоресцину.

Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні цетримідного агару відсутнє зростання ко-

лоній, наведених вище, або тести ідентифікації не підтвердили наявності *P. aeruginosa*.

### 4-5. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4-5-1. Підготовка зразка та попередня інкубація. Готують зразок в розведенні 1:10 (або в іншому розведенні, визначеному, як наведено в розділі 3-4), використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). При випробуванні методом прямого висівання 10 мл підготовленого зразка або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять у відповідний об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону та перемішують.

При випробуванні методом мембранної фільтрації 10 мл підготовленого зразка, або його кількість, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При випробуванні трансдермальних пластирів об'єм зразка, підготовленого, як наведено в пункті 4-5-1 статті (2.6.12), що відповідає 1 пластиру, пропускають через стерильний мембранний фільтр. При необхідності мембранний фільтр відмивають, використовуючи піджоху кількість промивної рідини. Мембранний фільтр поміщають в 100 мл або інший об'єм (визначений, як наведено в пункті 3-4) соєво-казеїнового бульйону.

Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

4-5-2. Відбір матеріалу та пересівання. Проводять пересівання на поверхню манітно-сольового агару та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

4-5-3. Інтерпретація результатів. Зростання жовтих або білих колоній грампозитивних коків, оточених жовтою зоною (що свідчить про ферментацію маніту), свідчить про можливість наявності *S. aureus* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестом на плазмокоагулазу. *S. aureus* дає позитивну реакцію на плазмокоагулазу.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні манітно-сольового агару відсутнє зростання колоній, наведених вище, або тести ідентифікації не підтвердили наявності *S. aureus*.

Наведений нижче розділ має інформаційний характер.

## 5. РЕКОМЕНДОВАНІ РОЗЧИНИ, ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ТА БІОХІМІЧНІ ТЕСТИ

Наведені в статті (2.6.13) розчини та живильні середовища можуть бути використані при визначенні мікробіологічної чистоти, зокрема для проведення біохімічних тестів. Допускається використання інших живильних середовищ або модифікація складу

середовища шляхом зміни джерел амінного азоту за умови доказу придатності альтернативних або модифікованих живильних середовищ.

#### Типова нейтралізуюча рідина

Полісорбат-80	30 г
Лецитин (ячний)	3 г
Гістидину гідрохлорид	1 г
Пептон (м'ясний або казеїновий)	1 г
Натрію хлорид	4.3 г
Калія дигідрофосфат	3.6 г
Динатрію гідрофосфат дигідрат	7.2 г
Вода очищена	1000 мл

Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

Рекомендується для використання як розчинник при підготовці зразків лікарських засобів з метою нейтралізації антимікробної дії. В тому випадку, якщо розчин не володіє достатньою нейтралізуючою здатністю, збільшують концентрацію полісорбату-80 або лецитину або використовують нейтралізатори, наведені в Табл. 2.6.12.-2.

#### Цитратний агар Сімонса

Натрію хлорид	5.0 г
Магнію сульфат	0.2 г
Амонію дигідрофосфат	1.0 г
Дикалію гідрофосфат	1.0 г
Натрію цитрат	3.0 г
Бромтимоловий синій	0.08 г
Агар мікробіологічний	20.0 г
Вода очищена	1000 мл

Всі інгредієнти складу, окрім агару та бромтимолового синього, поміщають в ємність місткістю не менше 1500 мл, розчиняють в 500 мл свіжоприготованої дистильованої води, додають агар, доводять до 1000 мл свіжоприготованою водою очищеною та нагрівають до розплавлення агару. Встановлюють рН так, щоб після стерилізації його значення склало  $7.2 \pm 0.1$ , додають 40 мл 0.2 % водного розчину бромтимолового синього, перемішують та розливають в пробірки по 5-7 мл. Стерилізують в паровому стерилізаторі при температурі 121 °С протягом 15 хв. Охолоджують так, щоб отримати скошену поверхню.

Рекомендується для проведення тесту на утилізацію цитрату: тест-мікроорганізм засівають мікробіологічною петлею на поверхню скошеного середовища в пробірках та інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С від 24 год до 48 год. Результат тесту вважають позитивним при зміні кольору середовища із зеленого на синій.

Позитивний контроль — тест- мікроорганізм *Salmonella*

Негативний контроль — тест- мікроорганізм *E. coli*

#### Трицукровий агар із залізом

Яловичий екстракт	3.0 г
Дріжджовий екстракт	3.0 г
Пептони (казеїновий та яловичий)	20.0 г
Натрію хлорид	5.0 г
Лактози моногідрат	1.0 г
Сахароза	10.0 г
Глюкози моногідрат	1.0 г
Заліза (III) амонію цитрат	0.3 г
Натрію тіосульфат	0.3 г
Феноловий червоний	25 мл
Агар	12.0 г
Вода очищена	1000 мл

Нагрівають до кипіння та кип'ять протягом 1 хв при перемішуванні. Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.4 \pm 0.2$ . Розливають середовище в пробірки так, щоб заповнити одну третину пробірки по висоті, стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації. Дають середовищу застигнути так, щоб отримати в одній пробірці стовпчик живильного середовища та скошену поверхню.

Рекомендується для ідентифікації *Salmonella*: тест-мікроорганізм засівають мікробіологічною петлею, наносячи невелику кількість спочатку на скошену поверхню, а потім уколом в стовпчик, та інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С від 24 год до 48 год.

Позитивний контроль — тест-мікроорганізм *Salmonella* (характерне зростання та зміна забарвлення середовища, див. пункт 4-3-3N).

#### Агар для виявлення пігменту флуоресцину

Панкреатичний гідролізат казеїну	10.0 г
Пептичний гідролізат тваринних тканин	10.0 г
Динатрію гідрофосфат безводий	20.0 г
Магнію сульфат гептагідрат	5.0 г
Гліцерин	10.0 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	1000 мл

Інгредієнти складу, за винятком гліцерину, розчиняють у воді очищеній, потім додають гліцерин. Нагрівають до кипіння та кип'ять протягом 1 хв при інтенсивному перемішуванні. Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7.2 \pm 0.2$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

Рекомендується для виявлення пігменту флуоресцину при ідентифікації *P. aeruginosa*: тест-мікроорганізм засівають мікробіологічною петлею на поверхню середовища в чашці Петрі та інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С не менше 72 год.

#### Агар для виявлення пігменту піоціаніну

Панкреатичний гідролізат желатину	20.0 г
Магнію хлорид безводий	1.4 г
Калію сульфат безводний	10.0 г
Гліцерин	10.0 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	1000 мл

## 2.6. Біологічні випробування

Інгредієнти складу, за винятком гліцерину, розчиняють у воді очищеній, потім додають гліцерин. Нагрівають до кипіння та кип'ячать протягом 1 хв при інтенсивному перемішуванні. Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення становило  $7,2 \pm 0,2$ . Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

Рекомендується для виявлення пігменту піоціаніну при ідентифікації *P. aeruginosa*: тест-мікроорганізм засівають мікробіологічною петлею на поверхню середовища в чашці Петрі та інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С не менше 72 год.

Позитивний контроль — тест-мікроорганізм *P. aeruginosa* (характерне зростання, див. пункт 4-4-1N).

**Тест на наявність цитохромоксидази.** Смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на цитохромоксидазу таносять скляною паличкою чисту добову культуру досліджуваних бактерій, що вирости на соєво-казеїновому агарі. Синє забарвлення, що з'являється через 2-5 хв, свідчить про позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

### Реактив на цитохромоксидазу

**Розчин № 1:** 1 % спиртовий розчин  $\alpha$ -нафтолу.

**Розчин № 2:** 1 % водний розчин *N,N*-диметил-п-фенілендіаміну дигідрохлориду.

Розчини придатні протягом 14 діб при зберіганні при температурі від 4 °С до 10 °С у флаконах нейтрального світлозахисного скла.

Перед використанням змішують розчини № 1 та № 2 в співвідношенні 2:3.

**Тест на індол.** Роблять пересівання в бульйон Хотінгера. Посіви інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С від 24 год до 48 год. За наявності бактеріального зростання наявність індолу встановлюють за появою червоного забарвлення при внесенні в середовище реактиву Ковача або Ерліха.

### Реактив Ковача

Спирт аміловий або ізоаміловий	75 мл
п-диметиламінобензальдегід	5 г
Кислота хлористоводнева концентрована	25 мл

Наважку п-диметиламінобензальдегіду розчиняють у спирті аміловому або ізоаміловому при нагріванні на водяній бані при температурі від 50 °С до 55 °С, охолоджують та повільно додають кислоту хлористоводневу концентровану. Розчин зберігають в захищеному від світла місці. Реактив має бути жовтого кольору.

### Реактив Ерліха

96 % спирт	95 мл
п-диметиламінобензальдегід	1 г
Кислота хлористоводнева концентрована	20 мл

Наважку п-диметиламінобензальдегіду розчиняють в 96 % спирті та повільно додають кислоту хлористоводневу концентровану. Розчин зберігають в захищеному від світла місці.

Позитивний контроль — тест-мікроорганізм *Salmonella* (позитивна реакція на індол).

Негативний контроль — тест-мікроорганізм *E. coli* (негативна реакція на індол).

**Тест на плазмокоагулазу (реакція плазмокоагуляції).**

Кров, узятую стерильним шприцем у кролика, поміщають в 5 % стерильний розчин натрію цитрату, відбирають плазму, розводять у співвідношенні 1:5 стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду *P* та розливають по 0.5 мл в стерильні пробірки. У кожену пробірку поміщають 1 петлю чистої добової культури стафілокока, що вирости на соєво-казеїновому агарі, та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 4 год до 6 год. Якщо протягом цього часу не спостерігається згортання плазми, реакцію плазмокоагуляції вважають за негативну. Одночасно з випробуванням проводять два контрольні досліди: 1) контроль розчину плазми, 2) контроль культури стафілококу, що дає позитивну реакцію на плазмокоагулазу. Допускається використовувати суху кролячу цитратну плазму промислового виробництва, яку готують згідно з інструкцією до застосування. ▲

## 2.6.14. БАКТЕРІАЛЬНІ ЕНДОТОКСИНИ

Випробування на бактеріальні ендотоксини (БЕТ — Бактеріальні ендотоксини тест) з використанням лізату амебоцитів мечохвоста (*Limulus polyphemus* або *Tachypleus tridentatus*) призначене для виявлення або кількісного визначення ендотоксинів, джерелом яких є грамнегативні бактерії. Існують три основні методологічні підходи проведення даного випробування: гель-тромб метод, заснований на утворенні гелю; турбідиметричний метод, заснований на появі каламутності після розщеплення ендогенного субстрату; хромогенний метод, заснований на появі забарвлення після розщеплення синтетичного пептид-хромогенного комплексу.

У даній статті описані такі шість методів.

Метод А — гель-тромб метод: граничне випробування;

Метод В — гель-тромб метод: кількісне випробування;

Метод С — турбідиметричний кінетичний метод;

Метод D — хромогенний кінетичний метод;

Метод E — хромогенний метод кінцевої точки;

Метод F — турбідиметричний метод кінцевої точки.

Випробування проводять будь-яким із шести наведених методів. При сумнівах або розбіжностях остаточний висновок приймають на підставі результатів, одержаних при проведенні випробування методом А, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Випробування проводять за методикою, що дозволяє уникнути забруднення ендотоксинами.

## 1. ОБЛАДНАННЯ

Проводять депірогенізацію всього скляного посуду й іншого термостійкого обладнання у сушильній шафі з використанням валідованого процесу. Звичайно використовуються мінімальні час і температура — 250 °С протягом 30 хв. Для пластмасового обладнання, наприклад, планшет для мікротитрування та наконечників для автоматичних піпеток, має бути показано, що воно не містить визначуваних ендотоксинів і заважаючих факторів, що впливають на результати випробування та не вносить заважаючі фактори у процес випробування.

**ПРИМІТКА:** У даній статті термін «пробірка» включає всі типи ємностей, наприклад, планшети для мікротитрування.

## 2. РЕАКТИВИ, ВИПРОБОВУВАНІ РОЗЧИНИ

### (1) Лізат амебоцитів

Лізат амебоцитів являє собою ліофілізований продукт, отриманий із лізату амебоцитів мечехвоста (*Limulus polyphemus* або *Tachypleus tridenantus*). Цей реактив повинен бути виготовлений у відповідності з вимогами уповноваженого органу.

**ПРИМІТКА:** Лізат амебоцитів реагує не тільки з ендотоксинами, але і з деякими β-глюканами. Можливе використання реактивів лізату амебоцитів, які не реагують з глюканами. Їх виготовляють, видаляючи із лізату амебоцитів фактор G, реагуючий із глюканами, але інгібуючи реакційну систему фактора G в лізаті амебоцитів. Ці реактиви можуть бути використані для випробування на наявність ендотоксинів за присутності глюканів.

### (2) Розчин лізату

Лізат амебоцитів розчиняють при легкому перемішуванні в воді для БЕТ або буферному розчині, у відповідності з рекомендаціями виробника лізату. Відновлений лізат зберігають охолодженим або замороженим в у відповідності з рекомендаціями виробника лізату.

### (3) Вода для БЕТ (вода для випробування на бактеріальні ендотоксини)

Вода для БЕТ являє собою *воду для ін'єкцій Р* або отриману іншим способом воду, для якої продемонстрована відсутність реакції з лізатом, що використовується в границях, які він визначає.

## 3. ПРИГОТУВАННЯ ОСНОВНОГО РОЗЧИНУ СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТУ ЕНДОТОКСИНУ

Основний розчин стандартного препарату ендотоксину готують зі стандартного препарату ендотоксину, каліброваного відносно Міжнародного Стандарту, наприклад, ендотоксину БСП.

Активність ендотоксину виражають у Міжнародних Одиницях (МО). Еквівалентність Міжнародного Стандарту в Міжнародних одиницях затверджена Всесвітньою Організацією Охорони здоров'я.

**ПРИМІТКА:** одна МО ендотоксину відповідає одній Ендотоксинівій одиниці (ЕО).

При приготуванні і зберіганні основного розчину стандартного препарату ендотоксину дотримуються умов інструкції, доданої до упаковки та зазначеній на етикетці.

## 4. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТУ ЕНДОТОКСИНУ

Після енергійного перемішування основного розчину стандартного препарату ендотоксину готують відповідну серію розведень цього розчину, використовуючи воду для проведення випробування на бактеріальні ендотоксини іспользуя воду для БЕТ.

Розчини використовують свіжоприготованими, щоб уникнути втрати їх активності в результаті адсорбції.

## 5. ПРИГОТУВАННЯ ВИПРОБОВУВАНИХ РОЗЧИНІВ

Випробовувані розчини готують розчиненням або розведенням лікарських субстанцій або лікарських препаратів з використанням води для БЕТ. Деякі субстанції або препарати розчиняють або розводять в інших водних розчинах. Якщо необхідно, доводять значення рН випробовуваного розчину (або одержаного з нього розведення) таким чином, щоб значення рН суміші лізату і випробовуваного розчину знаходилося в інтервалі значень, зазначеному виробником лізату, звичайно від 6.0 до 8.0. Доведення рН можна проводити за допомогою кислоти, лугу або підходячого буферного розчину, відповідно до рекомендацій виробника лізату. Розчини кислот або лугів можуть бути приготовані з концентрованих розчинів або твердих речовин за допомогою води для БЕТ у посуді, що не містить визначуваних ендотоксинів. Буферні розчини мають бути валідованими щодо відсутності визначуваних ендотоксинів та заважаючих факторів.

## 6. ВИЗНАЧЕННЯ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОГО РОЗВЕДЕННЯ

Максимально допустиме розведення (МДР) є максимально можливим розведенням зразка, при якому може бути визначений граничний вміст ендотоксинів. МДР обчислюють за формулою:

$$\text{МДР} = \frac{\text{граничний вміст ендотоксинів} \times \text{концентрація випробовуваного розчину}}{\lambda}$$

Граничний вміст ендотоксинів для парентеральних лікарських засобів обчислюють виходячи з максимальної дози лікарського засобу:

$$\frac{K}{M}$$

де:

*K* — гранична пірогенна доза ендотоксину на кілограм маси тіла ■,

*M* — максимальна рекомендована разова доза лікарського засобу на кілограм маси тіла ■.

Якщо препарат у вигляді ін'єкцій підлягає частому введенню через невеликі проміжки часу або неперервному введенні у вигляді інфузій, то *M* — це максимальна сумарна доза, введена на протязі 1 години.

Граничний вміст ендотоксинів для парентеральних лікарських засобів зазначають в окремих статтях у МО/мл, МО/мг, МО/одиночку біологічної активності і т.п.

Концентрація випробовуваного розчину:

— мг/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю маси (МО/мг),

— Одиницях/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю біологічної активності (МО/Одиницю),

— мл/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю об'єму (МО/мл).

$\lambda$  — зазначена на етикетці чутливість лізату (МО/мл) у гелі-тромб методі або найнижча концентрація на стандартній кривій у турбідиметричному або хромогенному методах.

## 7. ГЕЛЬ-ТРОМБ МЕТОДИ (А та В)

Метод ґрунтується на утворенні щільного гелю в присутності ендотоксинів і дозволяє виявити або кількісно визначити ендотоксини. Мінімальне значення концентрації ендотоксинів, необхідне для того, щоб викликати у стандартних умовах утворення

згустку лізату, дорівнює значенню чутливості лізату, зазначеному на етикетці. Для валідації випробування і гарантії його точності, підтверджують зазначену на етикетці чутливість лізату і проводять випробування на наявність заважаючих факторів відповідно до зазначень розділу 1. *Попередні випробування.*

### 1. ПОПЕРЕДНІ ВИПРОБУВАННЯ

(i) Підтвердження чутливості лізату, зазначеної на етикетці

Перед використанням розчину лізату у випробуванні підтверджують зазначену на етикетці чутливість, виражену в МО/мл, у чотирьох паралелях. Підтвердження чутливості лізату проводять у тих випадках, коли використовують нову серію лізату, або у випадку зміни в умовах експерименту, що може вплинути на результати випробування.

Готують розчини стандарту ендотоксину принаймні в чотирьох концентраціях, що дорівнюють  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0.5\lambda$  і  $0.25\lambda$ , розводячи основний розчин стандартного препарату ендотоксину водою для БЕТ.

Змішують у кожній пробірці розчин лізату з таким самим об'ємом одного з розчинів стандарту препарату ендотоксину (наприклад, аліквотним 0.1 мл). При використанні флаконів або ампул з ліофілізованим лізатом, призначених для проведення одного випробування, розчини стандартного препарату ендотоксину додають безпосередньо в флакон або ампулу. Реакційну суміш інкубують, уникаючи вібрації, протягом постійного періоду часу відповідно до рекомендацій виробника лізату (звичайно при температурі  $(37 \pm 1)$  °С протягом  $(60 \pm 2)$  хв). Випробування на цілісність гелю для пробірок: беруть кожну пробірку по черзі безпосередньо з інкубатора і перевертають її одним повільним рухом, приблизно на  $180^\circ$ . Якщо утворився стійкий гель, що залишається на місці після перевертання, результат реєструють як позитивний. Результат вважається негативним, якщо стійкий гель не утворився.

Таблиця 2.6.14.-1

Розчин	Концентрація ендотоксину/розчин, до якого прибавляють ендотоксин (Розріджувач)	Розріджувач	Коефіцієнт розведення	Отримана концентрація	Кількість паралельних проб
A	Відсутня / Випробовуваний розчин	—	—	—	4
B	$2\lambda$ / Випробовуваний розчин	Випробовуваний розчин	1	$2\lambda$	4
			2	$\lambda$	4
			4	$0.5\lambda$	4
			8	$0.25\lambda$	4
C	$2\lambda$ / Вода для БЕТ	Вода для БЕТ	1	$2\lambda$	2
			2	$\lambda$	2
			4	$0.5\lambda$	2
			8	$0.25\lambda$	2
D	Відсутня / Вода для БЕТ	—	—	—	2

Розчин А — випробування розчину зразка, що не містить ендотоксинів, що визначаються

Розчин В — випробування на наявність заважаючих факторів

Розчин С — контроль чутливості лізату, вказаної на етикетці

Розчин D — негативний контроль (вода для БЕТ)

Випробування вважається дійсним, якщо при найменшій концентрації розчинів стандартного препарату ендотоксину одержаний негативний результат у всіх паралельних рядах.

Найнижча концентрація в ряду концентрацій, що знижуються стандартного препарату ендотоксину, що викликає гелювання лізату, вважається кінцевою точкою. Визначають середнє геометричне концентрацій в кінцевих точках, розраховуючи середнє значення логарифму концентрацій в кінцевих точках для 4 рядів розведень, а потім — антилогарифму цієї величини, як вказано в наступній формулі:

Середнє геометричне значень концентрацій у кінцевих точках =

$$= \text{антилогарифм } \frac{\sum e}{f},$$

де:

$\sum e$  — сума логарифмів концентрацій у кінцевій точці використовуваних рядів розведень;

$f$  — кількість паралельних проб.

Середнє геометричне значення концентрацій у кінцевих точках є розрахунковою чутливістю розчину лізату (МО/мл). Якщо вона не менша 0.5 і не більша 2, зазначена на етикетці чутливість лізату вважається підтвердженою і використовується при виконанні випробувань з використанням цього лізату.

#### (ii) Випробування на наявність заважаючих факторів

Готують розчини А, В, С та D, як зазначено в Табл. 2.6.14.-1, використовуючи випробовувані розчини в розведенні, меншому МДР, що не містять визначуваних ендотоксинів відповідно до зазначень розділу 1. Попередні випробування, (i) Підтвердження чутливості лізату, зазначеної на етикетці.

Середнє геометричне значення концентрацій розчинів В і С у кінцевій точці обчислюють за формулою, зазначеною у розділі 1. Попередні випробування, (i) Підтвердження чутливості лізату, зазначеної на етикетці.

Якщо в умови експерименту вносять зміни, які можуть вплинути на результат випробування, то випробування на наявність заважаючих факторів повинно бути повторено.

Випробування вважається дійсним, якщо всі паралельні ряди розчинів А та D демонструють відсутність реакції, а результат для розчину С підтверджує вказану на етикетці чутливість лізату.

Якщо чутливість лізату, визначена для розчину В, не менше 0.5л та не більше визначена для розчину В, не менша 0.5 та не більша 2, випробовуваний розчин не містить заважаючих факторів у використаних умовах випробування. У протилежному разі розчин включає фактори, що заважають проведенню випробування.

Якщо при проведенні випробування випробовуваний зразок включає заважаючі фактори у розведенні, меншому за значення МДР, повторюють випробування на наявність заважаючих факторів, використовуючи більш високе розведення, але не перевищує значення МДР. Використання більш чутливого лізату дозволяє використовувати більш розведений випробовуваний зразок. Це може бути застосоване для усунення заважаючих факторів. Це може бути застосовано для усунення заважаючих факторів.

Заважаючі фактори можна усунути, використовуючи відповідну валідовану методику пробопідготовки, що включає, наприклад, фільтрацію, нейтралізацію, діаліз або термообробку. Для підтвердження, того що обрана методика пробопідготовки ефективно усуває заважаючі фактори без втрати ендотоксинів, повторюють випробування на наявність заважаючих факторів, використовуючи випробовуваний зразок, що піддавали обробці обраним методом після додавання до нього стандартного препарату ендотоксину.

## 2. ГРАНИЧНЕ ВИПРОБУВАННЯ (МЕТОД А)

### (i) Методика

Розчини А, В, С і D готують, як зазначено в Табл. 2.6.14.-2, і проводять випробування для цих розчинів за методикою, зазначеною в розділі 1. Попередні випробування, (i) Підтвердження чутливості лізату, зазначеної на етикетці.

Таблиця 2.6.14.-2

Розчин	Концентрація ендотоксину/розчин, до якого додають ендотоксин	Кількість паралельних проб
А	Відсутня / Розведений випробовуваний розчин	2
В	2 л / Розведений випробовуваний розчин	2
С	2 л / Вода для БЕТ	2
D	Відсутня / Вода для БЕТ	2

Готують розчин А і розчин В (позитивний контроль препарату), використовуючи розведення, що не перевищує значення МДР, та проводять випробування за методикою, зазначеною в розділі 1. Попередні випробування, (ii) Випробування на наявність заважаючих факторів. Розчини В і С (позитивні контролю) містять стандартний препарат ендотоксину в концентрації, у два рази перевищуючої чутливість лізату, зазначену на етикетці. Розчин D (негативний контроль) містить воду для БЕТ.

### (ii) Інтерпретація результатів

Випробування вважається дійсним, якщо обидві паралельні проби розчину В та С дають позитивний результат, та обидві паралельні проби розчину D дають негативний результат.

## 2.6. Біологічні випробування

Випробовуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо для обох паралельних проб розчину А отриманий негативний результат.

Випробовуваний зразок не витримує випробування, якщо для обох паралельних проб розчину А отриманий позитивний результат.

Якщо для однієї з паралельних проб розчину А отримано позитивний результат, а для другої паралельної проби — негативний, випробування повторюють. Випробовуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо при проведенні повторного випробування для обох паралельних проб розчину А отримано негативний результат. Якщо позитивний результат отриманий для однієї або обох паралельних проб розчину А, то випробовуваний зразок не витримує випробування.

Проте, якщо випробовуваний зразок не витримує випробування при розведенні, що не перевищує значення МДР, випробування можна повторити при більшому розведенні, що не перевищує значення

### 3. КІЛЬКІСНЕ ВИПРОБУВАННЯ (МЕТОД В)

#### (і) Методика

Дана методика дозволяє визначити вміст бактеріальних ендотоксинів у випробовуваному розчині за допомогою титрування до кінцевої точки. Розчини А, В, С і D готують, як зазначено в Табл. 2.6.14.-3, та проводять випробування цих розчинів відповідно до методики, описаної у розділі 1. Попередні випробування, (і) Підтвердження чутливості лізату, зазначеної на етикетці.

#### (ii) Розрахунок і інтерпретація результатів

Випробування вважається дійсним, якщо виконуються такі три умови:

- (а) обидві паралельні проби розчину D (негативний контроль) дають негативний результат,
- (б) обидві паралельні проби розчину В (позитивний контроль препарату) дають позитивний результат,
- (с) середнє геометричне значень концентрацій, одержане для розчину С в кінцевій точці, знаходиться в межах від 0.5 до 2.

Для визначення концентрації ендотоксинів у розчині А, обчислюють концентрації для кожної паралельної проби в кінцевій точці, множачи коефіцієнт розведення кожної кінцевої точки на.

Концентрація ендотоксинів у випробовуваному розчині дорівнює концентрації паралельних проб в кінцевій точці. Концентрація ендотоксинів у випробовуваному розчині дорівнює середньому геометричному значенню концентрацій. Якщо випробування проводиться для розведеного випробовуваного розчину, обчислюють концентрацію ендотоксинів у вихідному розчині, множачи результат на коефіцієнт розведення.

Якщо жодне з розведень випробовуваного розчину не дає позитивного результату при проведенні випробування, дійсність якого підтверджена, реєструють концентрацію ендотоксинів як меншу за (або, якщо випробування проводилось для розведеного зразка, як меншу за значення, помножене на найнижчий коефіцієнт розведення зразка). Якщо всі розведення дають позитивний результат, реєструють концентрацію ендотоксинів як таку, що дорівнює або перевищує найбільший коефіцієнт розведення,

Таблиця 2.6.14.-3

Розчин	Концентрація ендотоксину/розчин, до якого прибавляють ендотоксин (Розріджувач)	Розріджувач	Коефіцієнт розведення	Отримана концентрація	Кількість паралельних проб
А	Відсутня / Випробовуваний розчин	Вода для БЕТ	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
В	2 λ / Випробовуваний розчин		1		2
С	2 λ / Вода для БЕТ	Вода для БЕТ	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0.5 λ	2
			8	0.25 λ	2
Д	Відсутня / Вода для БЕТ	—	—	—	2

Розчин А — випробовуваний в розведенні, що не перевищує МДР, для якого були проведені випробування на наявність заважаючих факторів. Подальші розведення випробовуваного розчину не повинно перевищувати МДР. Для приготування рядів розведень із 4 пробірок, що містять випробовуваний розчин в концентраціях 1, 1/2, 1/4, 1/8, які використовувались при проведенні випробувань на наявність заважаючих факторів, використовують воду для БЕТ. Можуть бути використані інші підходи розведення аж до МДР.

Розчин В — розчин А, що містить стандарт ендотоксину в концентрації 2λ (позитивний контроль препарату).

Розчин С — ряди розведень із 4 пробірок води для БЕТ, які містять стандартний препарат ендотоксину в концентраціях 2λ, λ, 0.5λ, 0.25λ.

Розчин Д — вода для БЕТ (негативний контроль).

помножений на 1 (наприклад, у Табл. 2.6.14.-3, вихідний коефіцієнт розведення 8).

Випробовуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо концентрація ендотоксинів в обох паралельних пробах менша за зазначену у відповідній окремій статті.

## 8. ФОТОМЕТРИЧНІ КІЛЬКІСНІ МЕТОДИ (С, D, E та F)

### 1. ТУРБІДИМЕТРИЧНІ МЕТОДИ (С та F)

Дані методи належать до фотометричних методів виміру збільшення ступеня каламутності. У залежності від принципу, покладеного в основу проведення випробування, зазначений метод може бути класифікований як турбідиметричний метод кінцевої точки або турбідиметричний кінетичний метод.

Турбідиметричний метод кінцевої точки (Метод F) заснований на кількісній залежності концентрації ендотоксинів від ступеня каламутності (поглинання або пропускання) реакційної суміші наприкінці інкубаційного періоду.

Турбідиметричний кінетичний метод (Метод С) заснований на вимірі часу (порогового часу), необхідного для досягнення попередньо визначеної величини поглинання або пропускання, або ступеня каламутності реакційної суміші.

Випробування проводять при температурі інкубації, рекомендованої виробником лізату (звичайно  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ).

### 2. ХРОМОГЕННІ МЕТОДИ (D та E)

Дані методи використовують для виміру кількості хромофору, що вивільнився з відповідного хромогенного пептиду в результаті реакції ендотоксинів з лізатом. У залежності від принципу, покладеного в основу випробування, цей метод може бути класифікований як хромогенний метод кінцевої точки або хромогенний кінетичний метод.

Хромогенний кінетичний метод (Метод E) заснований на кількісній залежності концентрації ендотоксинів від кількості хромофору, що вивільнився до кінця інкубаційного періоду.

У процесі випробування хромогенного кінетичного методу (метод D) вимірюють час (час початку), необхідний для досягнення попередньо визначеної величини оптичної густини реакційної суміші або інтенсивності забарвлення реакційної суміші.

Випробування проводять при температурі інкубації, рекомендованої виробником лізату (звичайно  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ).

### 3. ПОПЕРЕДНІ ВИПРОБУВАННЯ

Для перевірки точності або валідації випробування турбідиметричним методом або хромогенним ме-

тодом проводять попередні випробування, що дозволяють переконатися в надійності критеріїв для стандартної кривої та в тому, що випробовуваний розчин не є фактором, заважаючим проведенню випробування.

Валідація методики випробування необхідна, якщо в умови експерименту внесені будь-які зміни, що можуть вплинути на результати випробування.

#### (i) Перевірка надійності критеріїв для стандартної кривої

Випробування повинно виконуватись для кожної серії реактиву лізату.

Готують не менше як три розведення розчину стандартного препарату ендотоксину в межах інтервалу концентрацій, вказаних виробником лізату, для отримання стандартної кривої зата. Використовуючи не менше як три паралельні ряди кожного розведення розчину стандартного препарату ендотоксину; проводять випробування відповідно до рекомендацій виробника лізату (об'ємні співвідношення, час інкубації, температура, рН та ін.).

Якщо при проведенні випробування кінетичним методом необхідний інтервал перевищує 2 логарифми, включають додаткові розведення стандартного препарату ендотоксину для того, щоб розмежувати кожне підвищення логарифма на одиницю в інтервалі значень стандартної кривої.

Абсолютна величина коефіцієнта кореляції,  $r$ , має дорівнювати або бути вищою за 0.980 для інтервалу концентрацій ендотоксинів, зазначених виробником лізату.

#### (ii) Випробування на наявність заважаючих факторів

Вибирають значення концентрації ендотоксинів, що лежить у середині інтервалу значень стандартної кривої або близьке до цього значення.

Випробування вважаються дійсними, якщо виконуються наступні умови:

- абсолютне значення коефіцієнту кореляції стандартної кривої, побудованої з використанням розчину С, більше чи дорівнює 0.980;
- результат, отриманий з використанням розчину D, не перевищує контрольного значення, вказаного в інструкції до застосування реактиву лізату, що використовується, або менше границі виявлення ендотоксинів для реактиву лізату, що використовується.

Обчислюють середнє значення кількості доданих ендотоксинів, віднімаючи середню концентрацію ендотоксинів у розчині (якщо вони присутні) (розчин А, Табл. 2.6.14.-4) із середньої концентрації ендотоксинів у розчині, що містить додані ендотоксини (розчин А, Табл. 2.6.14.-4).

Випробовуваний розчин не містить заважаючих факторів, якщо в умовах проведення випробування концентрація ендотоксинів, доданих у випробовува-



## 2.6. Біологічні випробування

Таблиця 2.6.14.-4

Розчин	Концентрація ендотоксинів	Розчин, до якого додається ендотоксин	Кількість паралельних проб
A	Відсутня	Випробовуваний розчин	Не менше 2
B	Середня концентрація на стандартній кривій	Випробовуваний розчин	Не менше 2
C	Не менше 3 концентрацій (найнижчу концентрацію позначають λ)	Вода для БЕТ	Кожна концентрація не менше 2
D	Відсутня	Вода для БЕТ	Не менше 2

Розчин А — випробовуваний розчин, який може бути розведений треба розводити до значення, що не перевищує МДР;

Розчин В — випробовуваний зразок у тім самім розведенні, що і розчин А, який містить додані ендотоксини в концентрації, що дорівнює значенню середньої концентрації на стандартній кривій або близькій до неї;

Розчин С — розчин стандартного препарату ендотоксину у концентраціях, використовуваних при валідації методу відповідно до зазначеного в розділі 3. Попередні випробування, (i) Перевірка надійності критеріїв для стандартної кривої (позитивний контроль);

Розчин D — вода для БЕТ (негативний контроль).

ний розчин, знаходиться в інтервалі від 50 % до 200 % від відомої концентрації доданих ендотоксинів, після віднімання концентрації ендотоксинів, виявлених у розчині без доданих ендотоксинів.

Якщо значення вмісту ендотоксинів перебуває за межами зазначеного інтервалу, вважається, що випробовуваний зразок містить заважаючі фактори. Проводять повторне випробування при більшому розведенні, що не перевищує МДР. Крім того, заважаючі фактори випробовуваного зразка або розведеного випробовуваного розчину, котрі не перевищують МДР, можливо усунути, використовуючи відповідну валідовану методику пробопідготовки, що включає, наприклад, фільтрацію, нейтралізацію, діаліз або термообробку. Для підтвердження того, що вибрана методика пробопідготовки ефективно усуває заважаючі фактори без втрати ендотоксинів, повторюють випробування на наявність заважаючих факторів, використовуючи випробовуваний зразок, підготовлений у відповідності з вибраною методикою, після додавання до нього стандартного препарату ендотоксину.

### 4. ВИПРОБУВАННЯ

#### (i) Методика

Проводять випробування відповідно до методики, зазначеної у розділі 3. Попередні випробування, (ii) Випробування на наявність заважаючих факторів.

#### (ii) Розрахунок

Концентрацію ендотоксинів в кожному із паралельних розчинів А розраховують, використовуючи стандартну криву, отриману для позитивного контролю розчину С.

Випробування вважається дійсним, якщо виконуються такі три умови:

(1) результати, одержані для розчину С, відповідають вимогам до валідаційних випробувань, як зазначено у розділі 3. *Попередні випробування, (i) Перевірка надійності критеріїв для стандартної кривої;*

(2) величина вмісту ендотоксинів, одержана після вирахування з концентрації ендотоксинів, виявлених у розчині В, концентрації ендотоксинів, виявлених у розчині А, знаходиться в інтервалі від 50 % до 200 %.

(3) результат, одержаний для розчину D (негативний контроль), не перевищує граничного контрольного значення, зазначеного в інструкції до використовуваного лізату, або менше границі виявлення ендотоксинів для реактиву лізату, що використовується.

#### (iii) Інтерпретація результатів

Випробовуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо середнє значення вмісту ендотоксинів у паралельних пробах розчину А з урахуванням розведення і концентрації випробовуваного розчину менше за межу вмісту ендотоксинів для препарату. ▲

### 2.6.16. ВИПРОБУВАННЯ НА СТОРОННІ АГЕНТИ У ВІРУСНИХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Якщо для проведення випробування потрібна попередня нейтралізація вірусу, використовують специфічні антитіла, походження яких не пов'язане з людиною або мавпою; якщо культивування вірусу проводилося на тканинах, отриманих від птахів, то антитіла також не мають бути пташиного походження. Для приготування антисироватки використовують антиген для імунізації, отриманий з клітинної культури, що має походження, відмінне від походження вакцини та що не містить сторонніх агентів. Там де передбачено використання SPF-яєць, яйця відбирають зі зграї, що не містять вказані патогени (5.2.2).

#### ВІРУСНА ПОСІВНА СЕРІЯ

Зразки вірусної посівної серії відбирають під час збору вірусів і, якщо їх негайно не піддають випробуванню, зберігають при температурі нижче -40 °С.

Статевозрілі миші. Кожній з не менше 10 статевозрілих мишей масою від 15 г до 20 г вводять інтра-

церебрально 0.03 мл та внутрішньоочеревно 0.5 мл вірусної посівної серії. За мишами спостерігають протягом не менше 21 доби. Проводять розтин всіх загиблих мишей або таких, що проявили симптоми захворювання після закінчення перших 24 год випробування. Досліджують їх на наявність ознак вірусної інфекції як шляхом прямого макроскопічного огляду, так і перещепленням на відповідні суспензії тканин. Введення проводять інтрацеребрально та внутрішньоочеревно додатково не менше чим п'яти мишам, за якими спостерігають протягом 21 доби. Вірусна посівна серія витримує випробування, якщо жодна миша не проявляє симптомів інфекції, викликаной посівною серією. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % прищеплених мишей виживають протягом періоду спостереження.

**Новонароджені миші.** Кожній з не менше 20 мишей віком менше 24 год вводять інтрацеребрально 0.01 мл та внутрішньоочеревно не менше 0.1 мл вірусного посівного матеріалу. За мишами спостерігають щодня протягом не менше 14 діб. Проводять розтин всіх мишей загиблих або таких, що мають симптоми захворювання після закінчення перших 24 год випробування. Досліджують їх на наявність ознак вірусної інфекції як шляхом прямого макроскопічного огляду, так і перещепленням відповідних суспензій тканин. Перещеплення проводять інтрацеребрально та внутрішньоочеревно додатково не менше чим п'яти мишам, за якими спостерігають протягом 14 діб. Вірусна посівна серія витримує випробування, якщо жодна миша не виявляє симптомів інфекції, викликаной посівною серією. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % прищеплених мишей виживають протягом періоду спостереження.

**Мурчак.** Кожному з не менше 5 мурчаків масою від 350 г до 450 г вводять внутрішньоочеревно 5.0 мл вірусної посівної серії. За тваринами спостерігають протягом не менше 42 діб, відзначаючи наявність симптомів захворювання. Проводять розтин всіх мурчаків, що загибли або мають симптоми захворювання після закінчення перших 24 год випробування. Досліджують їх макроскопічно; тканини досліджують як мікроскопічно, так і культурально, відзначаючи наявність ознак інфекції. Тварин, що вижили протягом періоду спостереження, умертвляють та досліджують аналогічним чином. Вірусна посівна серія витримує випробування, якщо жодний мурчак не виявляє ознак інфекції, викликаной вірусною посівною серією. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % мурчаків виживають протягом періоду спостереження.

**Спіроплазма.** Вірусна посівна серія, що вирощена в клітинах комах, має бути вільною від спіроплазм, це має бути продемонстровано валідованим методом, схваленим компетентним уповноваженим органом.

## ВІРУСНА ПОСІВНА СЕРІЯ ТА ЗБІР ВІРУСІВ

Зразки відбирають під час збору вірусів і, якщо їх негайно не піддають випробуванню, зберігають при температурі нижче  $-40^{\circ}\text{C}$ .

**Відсутність бактерій та грибів.** Зразок об'ємом 10 мл має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Мікоплазми.** Зразок об'ємом 10 мл має витримувати випробування на мікоплазми (2.6.7).

**Мікобактерії (2.6.2).** Зразок об'ємом 5 мл випробовують на наявність *Mycobacterium spp.* методами культивування, що мають відому чутливість відносно визначення цих організмів.

**Випробування культури клітин на інші сторонні агенти.** Нейтралізовані зразки, еквівалентні 500 дозам вакцини для застосування людиною, але не менше 50 мл, якщо немає інших зазначень, випробовують на наявність сторонніх агентів інокуляцією в безперервні культури клітин нирок мавп та людини. Якщо вірус культивованій на клітинах мавп або людини, нейтралізований збір вірусів також випробовують на окремій культурі цих клітин. Якщо вірус вакцини культивованій не на культурі клітин людини або мавпи, то інокують клітини того різновиду, на якому він культивованій. Клітини інкубують при температурі  $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  та спостерігають протягом 14 діб. Вірусна посівна серія або збір вірусів витримує випробування, якщо ні в одній з культур клітин не виявляється ознак будь-яких сторонніх агентів. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % культур клітин залишаються життєздатними.

**Віруси птахів (потрібно тільки для вірусних посівних серій, що вирощені на тканинах пташиного походження та збору вірусів, що вирощені на первинних тканинах пташиного походження).** Нейтралізують зразок, еквівалентний 100 дозам вакцини для застосування людиною, але не менше 10 мл. Використовуючи по 0.5 мл на кожне яйце, інокують групу запліднених SPF-яєць віком від 9 до 11 діб в алантоїсну рідину, а іншу групу, віком від 5 до 7 діб, — в жовтковий мішок. Інкубують протягом 7 діб. Вірусна посівна серія або збір вірусів витримує випробування, якщо в алантоїсних рідинах та рідинах жовткових мішків не виявляються гемаглютинуючі агенти та якщо всі ембріони та хориоалантоїсні мембрани, досліджені на загальну патологію, є нормальними. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % інокульованих ембріонів виживають протягом 7 діб.

**Віруси комах (потрібно тільки для вірусів, що вирощені в клітинах комах).** Нейтралізовані зразки, еквівалентні 500 дозам вакцини для застосування людиною, але не менше 50 мл, якщо немає інших зазначень, ви-

## 2.6. Біологічні випробування

пробують на наявність сторонніх агентів інокуляцією як мінімум в одну культуру клітин, відмінну від тієї, що використовується у виробництві та допустиму для вірусів комах. Це дає можливість виявити арбовірус людини. Вибір клітин схвалюється компетентним повноважним органом, береться до уваги походження виробничої культури клітин та вірогідних забрудників, які можуть бути виявлені вибраними клітинами. Клітини інкубують при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  та спостерігають протягом 14 діб. Вірусна посівна серія або збір вірусів витримує випробування, якщо ні в одній з культур клітин не виявляється ознак будь-яких сторонніх агентів. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % культур клітин залишаються життєздатними.

### ВИРОБНИЧА КУЛЬТУРА КЛІТИН: КОНТРОЛЬНІ КЛІТИНИ

Контрольні клітини вивчають під мікроскопом на відсутність будь-якої цитопатичної дегенерації вірусного походження. Вивчення проводять протягом періоду інкубації, але не менше, чим протягом 14 діб після інокуляції виробничої культури клітин. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % контрольних культур клітин виживають до кінця періоду спостереження.

У момент останнього збору вірусів, але не раніше, чим на 14-у добу, проводять наведені нижче випробування.

**Гемадсорбуючі віруси.** Не менше 25 % контрольних культур випробовують на наявність гемадсорбуючих вірусів шляхом додавання еритроцитів мурчаків. Якщо не можливо провести випробування на гемадсорбуючі віруси, необхідно провести випробування на гемоаглютинуючі віруси. Якщо необхідно еритроцити мурчаків можна зберігати при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  протягом не більше 7 діб. Культуру ділять на дві рівні частини; стан однієї половини оцінюють після інкубації протягом 30 хв при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , а стан іншої половини – після інкубації протягом 30 хв при температурі від  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ . Не має виявлятися ознак наявності гемадсорбуючих агентів.

**Випробування культури клітин на інші сторонні агенти.** Збирають надосадову рідину контрольних клітин та випробовують на наявність сторонніх агентів інокуляцією в культури клітин нирок мавп та людини. Якщо вірус культивованій на культурі клітин ссавців, окрім культури клітин людини або мавпи, то інокулюють клітини того різновиду, на якому він культивованій, але з окремої партії. На кожній клітинній системі випробовують не менше 5 мл. Інокульовані культури інкубують при температурі  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  та спостерігають протягом 14 діб. Не має виявлятися ознак наявності сторонніх агентів.

Якщо виробнича культура клітин підтримується при температурі, відмінній від  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ , проводять до-

даткове випробування на сторонні агенти при тій температурі з використанням клітин того самого типу, який використовується для вирощування вірусу.

Якщо вірус вирощується в клітинах комах, об'єднаний зразок надосадової рідини також інокулюється, щонайменше в одну культуру клітин, відмінну від тієї, що використовується у виробництві та допустиму для вірусів комах. Це дає можливість виявити арбовірус людини. Клітини інкубують при температурі  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  та спостерігають протягом 14 діб. Не має виявлятися ознак наявності сторонніх агентів.

**Віруси пташиного лейкозу (потрібно тільки для вірусів, що вирощені на первинних тканинах пташиного походження).** Тест на віруси пташиного лейкозу проводять, використовуючи 5 мл надосадової рідини контрольних клітин.

### КОНТРОЛЬНІ ЯЙЦЯ

**Гемаглютинуючі агенти.** По 0.25 мл алантоїсної рідини кожного з яєць випробовують на гемаглютинуючі агенти шляхом безпосереднього змішування з курячими еритроцитами, і далі проводять пасажі в SPF-яйця таким чином: з 5 мл об'єднаного зразка амніотичних рідин контрольних яєць вводять по 0.5 мл в алантоїсну та амніотичну порожнини SPF-яєць. Контрольні яйця витримують випробування, якщо ні в одному випадку не виявляються ознаки наявності гемаглютинуючих агентів.

**Віруси пташиного лейкозу.** Використовують зразок об'єднаних амніотичних рідин контрольних яєць загальним об'ємом 10 мл. Проводять ампліфікацію шляхом п'яти пасажів на культурах клітин курячих ембріонів, що не містять вірусів лейкозу; випробування на пташиний лейкоз проводять з використанням клітин, отриманих в п'ятому пасажі. Контрольні яйця витримують випробування, якщо не виявляються ознаки наявності вірусів лейкозу.

**Інші сторонні агенти.** По 5 мл зразків об'єднаних амніотичних рідин контрольних яєць інокулюють в культури клітин нирок мавп та людини. Культури клітин спостерігають протягом 14 діб. Контрольні яйця витримують випробування, якщо не виявляються ознаки наявності сторонніх агентів. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % інокульованих культур клітин виживають до кінця періоду спостереження.

### 2.6.18. ВИПРОБУВАННЯ ЖИВИХ ВІРУСНИХ ВАКЦИН НА НЕЙРОВІРУЛЕНТНІСТЬ

У кожному випробуванні використовують не менше десяти мавп з негативною серологічною реакцією по відношенню до випробуваного вірусу. Якщо немає

інших вказівок, кожній з мавп в таламічний відділ кожної півкулі вводять не більше 0.5 мл випробовуваного матеріалу. Загальна кількість введеного кожній мавпі вірусу має бути не менше за кількість, що міститься в рекомендованій одиничній дозі для людини вакцини. Для перевірки на предмет інфікування диким нейровірулентним вірусом контрольну групу, що включає не менше чотирьох мавп, розміщують у тих самих клітках, що і групу заражених мавп, або в безпосередній близькості від них. Заражених мавп спостерігають протягом 17-21 днів, відмічаючи виникнення ознак паралічу та інших неврологічних виявів; мавп з контрольної групи спостерігають протягом того самого періоду плюс додатково 10 днів. Тварини, загиблі протягом перших 48 ч після ін'єкції, вважаються загиблими з причин неспецифічного характеру і можуть бути замінені іншими. Результати випробування вважають невірогідними, якщо: більше 20 % заражених мавп гине з неспецифічних причин; зразки сироватки крові, відібрані у мавп контрольної групи, в момент інокуляції випробовуваних тварин та через 10 днів після евтаназії останніх мають ознаки інфекції, викликані диким вірусом випробовуваного типу або вірусом кору. На завершальній стадії періоду спостереження проводять розтин та гістопатологічні дослідження відповідних відділів мозку на предмет поразки центральної нервової системи. Матеріал витримує випробування, якщо не виявляється неочікуваних клінічних або гістопатологічних ознак поразки центральної нервової системи, яка може бути викликана введеним вірусом.

#### 2.6.19. ВИПРОБУВАННЯ НА НЕЙРОВІРУЛЕНТНІСТЬ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПОЛІОМІЄЛІТУ (ОРАЛЬНОЇ)

Мавпи, що використовуються у випробуванні на нейровірулентність, мають витримувати вимоги, наведені в окремій статті «Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна)», і мати масу тіла не менше за 1.5 кг. Випробування патогенності для мавп сімейств *Macaca* або *Cercopithecus* проводиться в порівнянні з патогенністю стандартного вірусного препарату, призначеного для випробування на нейровірулентність. Препарати вводять у поперековий відділ центральної нервової системи після впливу відповідним седативним засобом, наприклад, кетаміну гідрохлоридом. Необхідно показати, що проба сироватки крові, відібрана до введення, не містить нейтралізуючих антитіл при розведенні 1:4, що використовується у випробуванні з кожним з трьох типів поліовірусу, взятому в кількості не більше за 1000 CCID<sub>50</sub>.

**Кількість мавп.** Вакцину та відповідний гомотиповий стандартний вірус випробовують одночасно в одній і тій самій групі мавп. Випробовувану вакцину та стандартний препарат вводять однакою кількості

тварин. Тварин розподіляють за групами для введення або вакцини, або стандартного препарату, а також по клітках випадковим шляхом, а їх приналежність кодують таким чином, щоб тип отриманого ними щеплення був прихований від спостерігачів та експертів, що досліджують зрізи. Кількість інокульованих мавп має бути такою, щоб при оцінці як вакцини, так і стандартного препарату було включено не менш одинадцяти мавп, позитивних відносно вірусу типів 1 та 2, і не менше 18 мавп, позитивних відносно вірусу типу 3 (позитивними вважають мавп, у яких виявилися специфічні патологічні зміни нейронів, викликані поліовірусом у центральній нервовій системі). З одним і тим самим гомотиповим стандартним препаратом можуть випробовуватися декілька партій вакцини. По можливості, використовують мавп з однієї і тієї самої карантинної групи. В інших випадках використовують мавп з двох груп, причому вакцина та стандартний препарат вводяться однакою кількості мавп з кожної групи. Якщо випробування проводиться протягом двох робочих днів, у кожний з днів вакцину та гомотиповий стандартний препарат вводять однакою кількості мавп.

**Вміст вірусу.** Вміст вірусу у вакцині та гомотиповому стандартному препараті регулюють таким чином, щоб він був, по можливості, однакою та знаходився в межах від  $10^{5.5}$  до  $10^{6.5}$  CCID<sub>50</sub> у 0.1 мл.

**Спостереження.** Всіх мавп спостерігають протягом 17-22 діб, відмічаючи ознаки поліомієліту або інших вірусних інфекцій. Мавп, що вижили протягом перших 24 год, або загиблих до 11-ї доби після щеплення, піддають розтину для визначення того, чи був причиною загибелі поліомієліт. При оцінці результатів тварин, загиблих з не пов'язаних з поліомієлітом причин, не враховують. Вмираючих та паралізованих тварин у важкому стані піддають евтаназії та розтину. Також проводять розтин всіх тварин, що вижили протягом періоду спостереження. Результати випробування вважають невірогідними, якщо протягом періоду спостереження більш як у 20 % тварин була виявлена інтеркурентна інфекція.

**Кількість зрізів, що досліджуються.** Гістологічному дослідженню з кожної мавпи піддають, як мінімум, поперековий та шийний відділи хребця, верхній та нижній довгастий мозок, середній мозок, таламус та моторну зону кори головного мозку. Готують зрізи завтовшки 15 мкм та забарвлюють їх галоціаніном. Мінімальна кількість зрізів, що досліджується, складає:

- (а) 12 зрізів, показових для всього поперекового відділу;
- (б) 10 зрізів, показових для всього шийного відділу;
- (в) 2 зрізи довгастого мозку;
- (г) 1 зріз мосту та мозочка;
- (д) 1 зріз середнього мозку;
- (е) по 1 зрізу з лівої та правої частин таламуса;

## 2.6. Біологічні випробування

(д) по 1 зрізу з лівої та правої частин рухової зони кори головного мозку.

**Визначення вірусної активності.** Для оцінки вірусної активності в поперечних зрізах спинного мозку та стовбура мозку використовують систему підрахунку ступеню важкості патологічних змін, відповідно до якого диференціюють клітинну інфільтрацію та деструкцію нейронів:

1. Наявність лише клітинної інфільтрації (мавпа не вважається позитивною);
2. Клітинна інфільтрація з мінімальним пошкодженням нейронів;
3. Клітинна інфільтрація зі значним пошкодженням нейронів;
4. Масивне пошкодження нейронів у поєднанні з клітинною інфільтрацією або без неї.

Отримані значення записують на стандартному бланку (за встановленою формою)<sup>(1)</sup>. Мавпа, на зрізах тканин якої є пошкоджені нейрони, але немає слідів від введення голки, вважається позитивною. Мавпа, на зрізах тканин якої є сліди від введення голки, але немає пошкоджених нейронів, не враховується як позитивна. Зрізи, на яких є пошкодження травматичного походження, але немає специфічних вірусних пошкоджень, при підрахунку не враховуються.

Рівні важкості пошкоджень засновані на даних, отриманих при вивченні гістологічних поперечних зрізів головного мозку (В), поперекового (L) та шийного (С) відділів спинного мозку. Для кожної позитивної мавпи розраховують рівень пошкоджень (LS) за формулою:

$$LS = \frac{\left[ \begin{array}{c} \text{Сумарне} \\ \text{число} \\ \text{поперечних} \\ \text{зрізів L} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Сумарне} \\ \text{число} \\ \text{поперечних} \\ \text{зрізів С} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Сумарне} \\ \text{число} \\ \text{поперечних} \\ \text{зрізів В} \end{array} \right]}{3}$$

Для кожної групи позитивних мавп розраховують середнє значення рівня пошкоджень.

**Оцінка.** Порівняння вірусної активності у вакцині та в стандартному препараті базується на ураженнях в поперековому відділі спинного мозку та ступеню поширення пошкоджень з цієї ділянки в шийний відділ та головний мозок. Позитивне або негативне рішення залежить від загального рівня для всіх випробовуваних тварин. При винесенні остаточного рішення мають враховуватися окремі тварини, що виявили надзвичайно високу активність вірусу, як в поперековій ділянці, так і в ділянках, в які пошкодження розповсюдилися з неї. Моновалентний матеріал витримує випробування, якщо нараховується необхідна кількість позитивних тварин та якщо ні в одному з клінічних та гістопатологічних досліджень

(1) Підхожа форма стандартного бланку наведена в «Вимогах до вакцини для профілактики для поліомієліту (оральної)» ( )

не виявлено істотних відмінностей між патогенністю вірусу вакцини та патогенністю стандартного препарату. Критерії прийнятності наведені нижче.

**Критерії.** Для кожної стандартної вакцини (типів 1, 2 та 3) проводять відповідну кількість (наприклад, чотири) кваліфікаційних випробувань на нейровірулентність з метою отримання даних про їх активність як основи для розробки критеріїв оцінки випробовуваних вакцин. Для повторних випробувань кожного зі стандартних вірусів обчислюють загальний середній рівень пошкоджень ( $M$ ), а також сумарну оцінку дисперсії ( $s^2$ ) та відхилення ( $s$ ) результатів випробування.

Критерії вірогідності результатів випробування стандартного препарату встановлюють на основі даних, накопичених у кваліфікаційних випробуваннях. Загальноприйнятих критеріїв немає.

Для лабораторій, що не мають достатнього досвіду роботи, може бути корисний такий емпіричний метод (див. Табл. 2.6.19) встановлення прийнятних граничних значень середнього рівня пошкоджень для стандартного препарату ( $X_{станд}$ ):

Таблиця 2.6.19.-1

	Нижня межа	Верхня межа
Типи 1 та 2	$M - s$	$M + s$
Тип 3	$M - s/2$	$M + s$

Якщо середній рівень пошкоджень випробовуваної вакцини складає  $X_{випр}$ , а  $C_1$ ,  $C_2$  та  $C_3$  - константи, що визначаються, як наведено нижче, то:

вакцина не витримує випробування, якщо:

$$X_{випр} - X_{станд} > C_1$$

вакцина може бути піддана повторному випробуванню, якщо:

$$C_1 < X_{випр} - X_{станд} < C_2$$

Якщо вакцина випробовується повторно, середні значення рівнів пошкоджень для випробовуваної вакцини та стандартного препарату розраховуються наново. Вакцина не витримує випробування, якщо:

$$\frac{X_{(випр1+випр2)} - X_{(станд1+станд2)}}{2} > C_3$$

Константи  $C_1$ ,  $C_2$  та  $C_3$  обчислюють за формулами:

$$C_1 = 2.3 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_2 = 2.6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_3 = 1.6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

де:

$N_1$  — кількість позитивних мавп при випробуванні вакцини;

$N_2$  — кількість позитивних мавп у двох випробуваннях;

2.3 — нормальне відхилення на 1 % рівні;

2.6 — нормальне відхилення на 0.5 % рівні;

1.6 — нормальне відхилення на 5 % рівні.

Випробування на нейровірулентність, в якому середній рівень пошкоджень для стандартного препарату ( $X_{станд}$ ) не узгоджується з попереднім досвідом, не використовується для оцінки випробовуваної вакцини. Якщо результати випробування вірогідні, обчислюють середній рівень пошкоджень для випробовуваної вакцини ( $X_{випр}$ ) та порівнюють його з відповідним значенням для гомотипової стандартної вакцини.

## 2.6.21. МЕТОДИ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

### 1. ВСТУП

Методи ампліфікації нуклеїнових кислот засновані на двох різних підходах:

1. ампліфікація нуклеїнової кислоти послідовності-мішені з використанням, наприклад, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR), лігазної ланцюгової реакції (ЛЛР, LCR) або ізотермічної ампліфікації рибонуклеїнової кислоти (РНК).
2. ампліфікація сигналу гібридизації з використанням, наприклад, для дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) методу розгалуженої ДНК (роз.ДНК, bDNA). У цьому разі ампліфікація сигналу досягається без піддавання нуклеїнової кислоти циклам ампліфікації, що повторюються.

У цій загальній статті як стандартний метод описується метод ПЛР. Можуть застосовуватися і альтернативні методи, якщо вони витримують вимоги, наведені нижче.

### 2. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Стаття встановлює вимоги до підготовки зразка до ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК і до виявлення специфічного продукту ПЛР. За допомогою ПЛР можуть бути виявлені певні послідовності ДНК. Послідовності РНК також можуть бути виявлені шляхом зворотньої транскрипції РНК у комплементарну ДНК (кДНК) з подальшою ампліфікацією.

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

ПЛР є процедурою, що дозволяє проводити в умовах *in vitro* ампліфікацію сегментів ДНК або РНК після зворотньої транскрипції у кДНК.

Після денатурації двониткової ДНК в одониткову два синтетичні олігонуклеотидні праймери протилежної орієнтації відпалюють на відповідних комплементарних послідовностях у ДНК, що підлягає ампліфікації. Короткі двониткові ділянки, що формуються в результаті специфічного спарування оснований праймерів і комплементарної послідовності ДНК, утворюють межі фрагмента ДНК, що ампліфікується, і є початковими точками для синтезу ДНК *in vitro* за участю термостабільної ДНК-полімерази.

Процес ампліфікації ДНК проходить циклами, що складаються із:

- теплової денатурації нуклеїнової кислоти (послідовності-мішені) на дві окремі нитки;
- специфічного відпалу праймерів на послідовності-мішені за підходящих умов реакції;
- нарощування праймерів, які пов'язані з обома нитками, під впливом ДНК-полімерази при підходящій температурі (синтез ДНК).

Повторні цикли теплової денатурації, відпалу праймерів і синтезу ДНК призводять до експоненціальної ампліфікації ділянки ДНК, обмеженої праймерами.

Специфічний продукт ПЛР, що називається ампліконом, може бути визначений різними методами з підходящою специфічністю і чутливістю.

При мультиплексних ПЛР-визначеннях використовують декілька праймерних пар, створених для одночасної ампліфікації різних мішеней у ході однієї реакції.

### 4. ВИПРОБОВУВАНИЙ МАТЕРІАЛ

У зв'язку з високою чутливістю ПЛР-зразки мають бути оптимальним чином захищені від попадання ззовні послідовностей-мішеней. Відбір проб, зберігання і транспортування випробовуваного матеріалу проводять в умовах, що мінімізують деградацію послідовності-мішені. У разі проведення випробування на РНК послідовності-мішені необхідно вжити особливих запобіжних заходів, зважаючи на високу чутливість РНК до деструктивної дії рибонуклеази. Слід враховувати, що деякі реактиви, що додаються, наприклад антикоагулянти або консерванти, можуть впливати на хід визначення.

### 5. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ

#### 5.1. Запобігання забрудненню

У зв'язку з ризиком забруднення слід суворо розмежовувати робочі зони залежно від використовуваних матеріалів і застосованої технології. Чинники, що враховуються, включають пересування персоналу, використання спеодягу, переміщення матеріалів, подачу повітря і процедури деконтамінації.

## 2.6. Біологічні випробування

- Систему слід розділити на відповідні зони, такі як:
- зона основної суміші (зона, в якій роботи здійснюються виключно з матеріалами, що не містять послідовностей-матриць, наприклад з праймерами, з буферними розчинами та ін.);
  - пре-ПЛР (зона, в якій ведеться робота з реактивами, зразками і контролями);
  - ПЛР-ампліфікація (зона, де з матеріалом, що ампліфікується, працюють у закритій системі);
  - пост-ПЛР детектування (єдина зона, в якій операції з матеріалом, що ампліфікується, проводяться у відкритій системі).

### 5.2. Підготовка зразків

При підготовці зразків послідовність-мішень, що підлягає ампліфікації, має бути ефективним і відтворним чином екстрагована або вивільнена з випробовуваного матеріалу так, щоб ампліфікація у вибраних реакційних умовах була здійснюемою. Можуть бути використані різні фізико-хімічні процедури екстракції та/або збагачення.

Добавки, присутні у випробовуваному матеріалі, можуть впливати на хід ПЛР. Для контролю наявності інгібіторів у випробовуваному матеріалі слід провести процедури, наведені в розділі 7.3.2.

У разі РНК-матриць слід ужити заходів, щоб уникнути рибонуклеазної активності.

### 5.3. Ампліфікація

Ампліфікація послідовності-мішені методом ПЛР проводиться в оптимізованих умовах, що циклічно змінюються (температурний профіль для денатурації двониткової ДНК, відпалу і нарощування праймерів; тривалість інкубації при вибраних температурах; швидкості зміни температури). Ці умови залежать від різних параметрів, наприклад:

- довжини і нуклеотидного складу праймера та послідовності-мішені;
- типу ДНК-полімерази, складу буфера й об'єму реакційної суміші, використовуваних при ампліфікації;
- типу використовуваного термоциклера та швидкості передачі тепла між приладом, реакційною пробіркою і реакційною рідиною.

### 5.4. Детектування

Амплікон, що утворився в результаті ПЛР, може бути ідентифікований за розміром, нуклеотидною послідовністю, шляхом хімічної модифікації або комбінацією цих параметрів. Визначення і характеристика за розміром можуть бути проведені методами гель-електрофорезу (з використанням агарозного або поліакриламідного гелів або капілярного електрофорезу) або колонкової хроматографії (наприклад, рідинної хроматографії). Визначення та характеристика за нуклеотидним складом можуть

бути проведені шляхом специфічної гібридизації зондів, що містять послідовність, комплементарну послідовності-мішені, або розщеплюванням ендонуклеазами рестрикції в ампліфікованому матеріалі сайтів рестрикції, специфічних для даної мішені. Визначення та характеристика за допомогою хімічної модифікації можуть бути проведені, наприклад, введенням в амплікони флуорофору з подальшою детекцією флуоресценції, що виникає в результаті збудження.

Детектування ампліконів також можна виконати, використовуючи мічені зонди, що дозволяють згодом провести радіоізотопне або імуноферментне визначення.

## 6. ОЦІНКА ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результат випробування є вірогідним лише за умови отримання однозначно позитивних результатів для позитивного контролю (контролів) і однозначно негативних результатів для негативного контролю (контролів). У зв'язку з виключно високою чутливістю методу ПЛР і з невід'ємним ризиком контамінації позитивні результати мають підтверджуватися двократним повним повторенням процедури випробування, якщо можливо, з новою аліквотою зразка. Зразок вважається позитивним, якщо принаймні один із повторних аналізів дає позитивний результат. Як тільки визначено вимірюваний поріг виявлення послідовності-мішені, необхідно використовувати систему для її кількісного визначення.

## 7. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ

### 7.1. Валідація системи кількісного визначення методом ПЛР

Програма валідації має включати валідацію обладнання і використовуваного методу ПЛР. Слід враховувати положення, викладені в *Посібнику ІСН* (розділ Q2B) «Валідація аналітичного методу: Методологія» (Validation of Analytical Method: Methodology).

Для валідації ПЛР тест-систем обов'язковим є застосування офіційних робочих стандартних препаратів або стандартних препаратів підприємства, каліброваних із використанням Міжнародних стандартів, для послідовностей-мішеней, при визначенні яких використовуватиметься дана система.

#### 7.1.1. Визначення позитивного граничного значення

При валідації кількісних випробувань має бути визначене позитивне граничне значення. Позитивне граничне значення визначається як мінімальна кількість послідовностей-мішеней у використовуваному об'ємі зразка, які можуть бути визначені в 95 % випробувань. Позитивне граничне значення залежить від таких взаємопов'язаних факторів, як

об'єм екстрагованого зразка й ефективність методології екстракції, транскрипція РНК-мішені в кДНК, процеси ампліфікації та детекції.

При визначенні межі детекції системи слід враховувати позитивні граничні значення для кожної послідовності-мішені та продуктивності результатів випробувань вище і нижче цих значень.

### 7.1.2. Системи кількісного визначення

При валідації кількісного випробування визначають такі параметри: точність, прецизійність, специфічність, межу кількісного визначення, лінійність, діапазон застосування і робастність.

## 7.2. Контроль якості реактивів

Усі реактиви, що мають критичне значення для використовуваної методології, мають проходити контроль перед застосуванням у рутинних випробуваннях. Їхня придатність або непридатність ґрунтується на заздалегідь визначених критеріях якості.

Праймери є критичними компонентами аналізу ПЛР, і тому слід приділяти особливу увагу їхньому дизайну, чистоті та валідації їх застосування для аналізів ПЛР. Праймери можуть бути модифікованими (наприклад, зв'язуванням з флуорофором або антигеном), що дозволить провести виявлення амплікону специфічними методами, якщо такі модифікації не інгібують правильну й ефективну ампліфікацію послідовності-мішені.

## 7.3. Контроль перебігу випробування

### 7.3.1. Зовнішні контролю

Для мінімізації ризику забруднення і забезпечення адекватної чутливості до складу кожної системи ПЛР вводять такі зовнішні контролю:

- позитивний контроль: у нім міститься певна кількість копій послідовності-мішені; ця кількість близька до позитивного граничного значення контролю, визначається індивідуально для кожної системи і кратна позитивному граничному значенню даної системи;
- негативний контроль: зразок відповідного матриксу, для якого доведена відсутність послідовностей-мішеней.

### 7.3.2. Внутрішній контроль

Внутрішніми контролями є певні послідовності нуклеїнових кислот, якщо немає інших зазначень, що містять ділянки зв'язування з праймерами. Внутрішні контролю мають ампліфікуватися так само ефективно, як і випробовувана послідовність-мішень, але амплікони мають чітко розрізнятися. Як внутрішній контроль використовується нуклеїнова кислота (ДНК/РНК) того самого типу, що і у випробовуваному матеріалі. Внутрішній контроль

краще додавати до випробовуваного матеріалу до виділення нуклеїнової кислоти, тому він може використовуватися як загальний контроль процесів (екстракції, зворотньої транскрипції, ампліфікації, детекції).

### 7.3.3. Пороговий контроль

Пороговий контроль для кількісних визначень — це та кількість випробовуваної речовини в зразку, яка визначена як порогова і яка не має бути перевищена. Зразок має містити відповідним чином відкалібровану в Міжнародних одиницях випробовувану речовину й аналізуватися паралельно при кожному кількісному визначенні.

## 7.4. Зовнішня оцінка якості

Участь у зовнішніх програмах оцінки якості є важливою процедурою забезпечення якості аналізів ПЛР для кожної лабораторії та кожного оператора.

*Даний розділ наводиться для інформації.*

## КЕРІВНИЦТВО З ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДУ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ (МАНК) У ВИЗНАЧЕННІ РНК ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С (НСV) У ПУЛАХ ПЛАЗМИ

### 1. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Більшість аналітичних методик, заснованих на ампліфікації нуклеїнових кислот, є якісними випробуваннями на наявність нуклеїнових кислот. Існує також декілька тестів для кількісного визначення (або внутрішніх, або комерційно доступних). Для визначення забруднення пулів плазми РНК НСV досить використовувати якісні тести, віднесені до категорії тестів, що визначають граничні значення вмісту домішок, як зазначено в Технічному керівництві з розробки монографій (журнал «*Pharmeuropa*», грудень 1999, розділ III «Валідація аналітичних методик»). У цьому керівництві описані лише методи валідації якісних аналітичних методик оцінки забруднення пулів плазми РНК НСV на основі ампліфікації нуклеїнових кислот. Тому двома найбільш важливими характеристиками для валідації аналітичного методу є його специфічність і межа виявлення. Крім того, має бути оцінена робастність аналітичного методу.

Однак цей документ також може бути використаний як основа для валідації ампліфікації нуклеїнових кислот загалом.

Відповідно до даного документа до аналітичної процедури відносять всю процедуру — від екстракції нуклеїнової кислоти до виявлення ампліфікованого продукту.

Якщо використовують комерційні набори для проведення частини або всієї аналітичної процедури,



## 2.6. Біологічні випробування

документовані виробником набору пункти валідації можуть замінити відповідну валідацію користувачем. Однак випробування з продуктивності набору з урахуванням призначеного застосування мають проводитися користувачем (наприклад, прецизійність, точність, діапазон, робастність).

### 2. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Специфічність характеризує здатність тесту однозначно визначити нуклеїнову кислоту в присутності інших речовин, які можуть міститися в зразку.

Специфічність аналітичних методів, заснованих на ампліфікації нуклеїнових кислот, залежить від вибору праймерів, вибору зонда (для аналізу кінцевого продукту) і суворості умов проведення випробування (як для стадії ампліфікації, так і для стадії виявлення).

При розробці праймерів і зондів має бути досліджена їхня специфічність відносно виявлення тільки РНК HCV шляхом порівняння вибраної послідовності з послідовностями, опублікованими в банках даних. Для HCV праймерів (і зондів) звичайно вибирають з областей 5'-некодової ділянки геному HCV, які високо консервативні у всіх генотипів.

Ампліфікований продукт має однозначно ідентифікуватися одним з низки методів, таких як проведення ампліфікації з "вкладеними" праймерами, аналіз із використанням ферментів рестрикції, секвенування або гібридизація зі специфічним зондом.

Для валідації специфічності аналітичного методу має бути проведене випробування не менше 100 зразків пулів плазми крові негативних за маркером РНК HCV. Підхожі зразки негативних пулів можуть бути отримані в Європейському Директораті з якості Медичних препаратів (EDQM).

Здатність аналітичного методу до виявлення всіх генотипів HCV також залежить від вибору праймерів, зондів і параметрів методу. Ця здатність має бути продемонстрована з використанням охарактеризованих стандартних панелей. Однак, зважаючи на складність отримання зразків деяких генотипів (наприклад, генотипу 6), мають бути на підходящому рівні детектовані генотипи переважаючих типів (наприклад, в Європі – генотипи 1 і 3).

### 3. МЕЖА ВИЯВЛЕННЯ

За межу виявлення даної аналітичної процедури беруть найменшу кількість нуклеїнової кислоти в зразку, яка може бути виявлена, але не обов'язково визначена як точне значення.

Аналітичний метод ампліфікації нуклеїнових кислот, використовуваний для виявлення РНК HCV у пулах плазми, звичайно дає якісні результати. Кількість можливих результатів тесту зводиться до

двох – або позитивний, або негативний. Хоча рекомендується визначення межі виявлення, на практиці для аналітичного методу ампліфікації нуклеїнових кислот має бути визначене позитивне граничне значення. Позитивним граничним значенням (відповідно до визначення в статті 2.6.21) є мінімальна кількість послідовностей-мішеней в об'ємі зразка, які можуть бути визначені в 95 % випробувань. На це позитивне граничне значення впливають розподіл вірусних геномів у індивідуальних випробовуваних зразках і такий фактор, як ефективність ферменту. Це може призвести до отримання різних 95 % граничних значень для окремих випробувань.

Для визначення позитивного граничного значення ряд розведень робочого реактиву або *БСП вірусу гепатиту С*, каліброваного за Міжнародним стандартом HCV WHO 96/790, мають бути випробовувані в різні дні для перевірки відхилень у результатах аналізу. Для проведення статистичного аналізу результатів має бути протестовано не менше 3 незалежних серій розведень з достатньою кількістю повторів для отримання у підсумку 24 результатів випробування для кожного розведення.

Наприклад, у лабораторії у різні дні можуть бути проведені випробування 3 серій розведень у 8 повторах для кожної з них, 4 серій розведень у 6 повторах для кожної з них або 6 серій розведень у 4 повторах для кожної з них. Для того щоб кількість розведень не була дуже великою, слід провести попереднє випробування (наприклад, із використанням логарифмічних розведень зразка пулу плазми) з одержанням попереднього позитивного граничного значення (тобто найбільшого розведення, що дає позитивний результат). Після цього діапазон розведень може бути вибраний в області набутого попереднього значення (з використанням, наприклад, логарифмічного фактора розведення 0.5 або менше і негативного пулу плазми для матриці розведення). Концентрація РНК HCV, яка може бути детектована в 95 % випробувань, може бути обчислена з використанням відповідних методів статистичної обробки.

Ці результати також можуть бути демонстрацією варіабельності результатів, що одержуються даним аналітичним методом в ході випробування і в різні дні.

### 4. РОБАСТНІСТЬ

Робастність аналітичного методу – це міра його здатності не змінюватися під впливом невеликих, але визначених варіацій параметрів методу, і показник його вірогідності при звичайному використанні.

На стадії розробки слід провести оцінку робастності. Вона має показати надійність аналітичної процедури з урахуванням певних варіацій параметрів методу. Для МАНК невеликі зміни параметрів методу можуть мати вирішальне значення. Проте в ході розробки методу його робастність може бути

продемонстрована вивченням невеликих змін концентрації реактивів (наприклад,  $MgCl_2$ , праймерів або дНТФ, дНТР). Для демонстрації робастності мають бути випробувані та визнані позитивними не менше 20 зразків пулів плазми крові, негативних за маркером РНК HCV, відібраних випадковим чином з додаванням до них РНК HCV до кінцевої концентрації, що в три рази перевищує заздалегідь визначене 95 % граничне значення.

Проблеми з робастністю можуть виникнути також у зв'язку з методами, в яких екстракції вірусної РНК передують стадія ультрацентрифугування. Тому для випробування робастності таких методів мають бути протестовані та визнані позитивними не менше 20 пулів плазми, що містять різні рівні РНК HCV, але такі, що не містять специфічних антитіл до HCV.

Запобігання перехресній контамінації має бути продемонстроване шляхом точного виявлення панелі (не менше 20 зразків), поперемінно заповненої зразками негативних пулів плазми і негативних пулів плазми з доданими високими концентраціями HCV (не менше 100-кратного 95 % граничного значення або не менше  $10^4$  МО/мл).

## 5. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ

Для таких біологічних випробувань, як МАНК, є ймовірність виникнення специфічних проблем, які можуть вплинути як на валідацію, так і на інтерпретацію результатів. Методики випробувань мають бути чітко описані у формі стандартних операційних процедур (СОП). У них мають бути зазначені:

- спосіб відбору проб (тип контейнерів і т. д.);
- приготування міні-пулів (де застосовно);
- умови зберігання перед аналізом;
- точний опис умов випробування, включаючи застережні заходи, для запобігання перехресній контамінації і розпаду вірусної РНК, використовуваних реактивів і стандартних препаратів;
- точний опис використовуваного приладу;
- детальні формули розрахунків, включаючи статистичну обробку.

Як задовільна перевірка відповідності системи і надійності аналітичної процедури, коли б вона не використовувалася, може бути рекомендоване включення підходящого контролю процесу (наприклад, підхоже розведення *БСП вірусу гепатиту С* або зразок плазми з доданням у неї зразком HCV, каліброваним за Міжнародним стандартом HCV WHO3 96/790).

*Технічна кваліфікація:* кожній критичній частині використовуваного приладу має відповідати програма кваліфікації з інсталяції та експлуатації. Після заміни критично важливого приладу (наприклад, термоциклерів) має бути документально підтверджена продуктивність шляхом проведення паралельного випробування відносно 8 зразків пулу плазми з доданням у неї РНК HCV до кінцевої концентрації,

відповідної заздалегідь визначеному триразовому 95 % граничному значенню. Усі результати мають бути позитивними.

*Кваліфікація оператора:* відносно кожного оператора, що бере участь у випробуванні, має діяти відповідна кваліфікаційна програма. Для підтвердження відповідного рівня підготовки кожен оператор повинен провести випробування не менше 8 повторів пулу плазми з доданням у неї РНК HCV з отриманням кінцевої концентрації, відповідної заздалегідь визначеному триразовому 95 % граничному значенню. Це випробування (8 повторних зразків) має бути повторене двічі, в два різні дні. Таким чином, мають бути проведені 24 випробування протягом трьох різних днів. Усі результати мають бути позитивними.

## КЕРІВНИЦТВО З ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДУ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ (МАНК) ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ В19 (В19V) У ПУЛАХ ПЛАЗМИ

### 1. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Згідно з вимогами Європейської Фармакопеї у пулах плазми, що використовуються для виробництва визначеного продукту, слід контролювати наявність ДНК вірусу В19 (В19V) і її порогову концентрацію, яка не має бути перевищена. Для виконання даної вимоги бажане проведення кількісного визначення ампліфікації нуклеїнових кислот. Найбільш важливими показниками для валідації методу кількісного МАНК є точність, прецизійність, специфічність, межа кількісного визначення, лінійність і діапазон. Крім того, має бути оцінена робастність аналітичного методу.

Це керівництво описує методи з валідації аналітичних методів МАНК для оцінки забруднення пулів плазми ДНК вірусу В19 (В19V) на основі керівництва ІСН. Проте цей документ також може бути використаний як основа для валідації кількісного МАНК загалом.

Відповідно до даного документа до аналітичної процедури відносять всю процедуру — від екстракції нуклеїнової кислоти до виявлення ампліфікованого продукту.

Якщо використовують комерційні набори для проведення частини або всієї аналітичної процедури, документовані виробником набору пункти валідації можуть замінити відповідну валідацію користувачем. Однак випробування з продуктивності набору з урахуванням призначеного застосування мають проводитися користувачем (наприклад, прецизійність, точність, діапазон, робастність).

### 2. ТОЧНІСТЬ

Точність характеризує ступінь відповідності між відомим дійсним значенням або довідковою вели-

## 2.6. Біологічні випробування

чиною і значенням, отриманим за даною методикою. Точність кількісного визначення залежить від калібрування визначення і варіацій на різних стадіях випробування. Незважаючи на це, рекомендується встановлювати точність специфікованого діапазону аналітичних процедур: найбільш важливим вимірюванням точності є область порогових концентрацій. У разі МАНК-визначень В19V у пулі плазми рекомендується оцінити точність каліброваного кількісного визначення на не менше 5 концентраціях (фактор розведення 0.5 log) БСП ДНК вірусу В19 для МАНК або іншого матеріалу, що відповідним чином калібрується в Міжнародних одиницях діючого Міжнародного стандарту ВООЗ ДНК В19V, що покриває область порогової концентрації, що в даний час рекомендується, 10.0 МО/мкл ДНК вірусу В19V (наприклад,  $10^5$  МО/мл,  $10^{4.5}$  МО/мл,  $10^4$  МО/мл,  $10^{3.5}$  МО/мл і  $10^3$  МО/мл), з не менше 3 повторами для кожного розведення. Слід повідомляти результати щодо точності для кожної певної концентрації, у відсотках від відомої кількості ДНК В19V. Це відображає технологічний рівень проведення відповідних випробувань, який також має бути встановлений, наприклад, в калібрувальних дослідженнях.

### 3. ПРЕЦИЗІЙНІСТЬ

Прецизійність виражає ступінь близькості результатів для серії вимірювань, одержаних на різних пробах того самого однорідного зразка. Прецизійність може розглядатися на 3 рівнях:

- збіжність виражає прецизійність методики при її виконанні в тих самих умовах протягом невеликого проміжку часу (прецизійність самого випробування); визначається одним випробуванням трьох повторів відповідних розведень В19V ДНК-позитивних зразків, каліброваних у Міжнародних одиницях, що покривають увесь кількісний діапазон випробування; розраховують коефіцієнт варіації для індивідуальних зразків (варіабельність самого випробування);
- внутрішньолабораторна прецизійність характеризує вплив внутрішньолабораторних варіацій (прецизійність між випробуваннями); встановлюється визначенням паралелей (рутинно використовуваних при визначенні) відповідних розведень В19V ДНК-позитивних зразків, що калібруються в Міжнародних одиницях і покривають весь кількісний діапазон випробування в різних умовах (наприклад, різні дні, аналітики, прилади, реактиви); розраховують коефіцієнт варіації для індивідуальних зразків (варіабельність між випробуваннями);
- відтворюваність характеризує прецизійність між різними лабораторіями (міжлабораторна прецизійність); визначається участю в сумісних кількісних МАНК-ДНК В19V дослідженнях, наприклад у програмах професійного тестування, включаючи порівняльний аналіз отриманих кількісних результатів, де застосовно.

### 4. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Специфічність характеризує здатність тесту однозначно визначити нуклеїнову кислоту в присутності передбачуваних речовин. Специфічність аналітичних методів, заснованих на ампліфікації нуклеїнових кислот, залежить від вибору праймерів, вибору зонда (для аналізу кінцевого продукту) і суворості умов проведення випробування (як для стадії ампліфікації, так і для стадії виявлення).

При розробці праймерів і зондів має бути досліджена їхня специфічність відносно виявлення тільки ДНК людського В19V шляхом порівняння вибраної послідовності з послідовностями, опублікованими в банках даних. Не має виявлятися гомологія розрахованих праймерів і зондів з послідовностями, не пов'язаними з В19V.

Ампліфікований продукт має однозначно ідентифікуватися одним із методів, таких як проведення ампліфікації з "вкладеними" праймерами, аналіз із використанням ферментів рестрикції, секвенування або гібридизація зі специфічним зондом.

Для валідації специфічності аналітичного методу має бути проведено випробування не менше 20 В19V ДНК-негативних пулів плазми і продемонстрована їхня нереакціоноздатність (негативність).

*Генотипи парвовірусу В19.* Міжнародний комітет з таксономії вірусів (ICTV) класифікував представників трьох генотипів штаму парвовірусу В19 людини. Генотип 1 є прототипом В19V, генотип 2 – вірусної послідовності типу А6 і генотип 3 – V9-подібності послідовності. Проведенням вивчення послідовностей з відповідними послідовностями В19V-генотипу, доступними з бази даних нуклеїнових кислот, мають розроблятися праймери і зразки для стабільного виявлення і кількісного визначення генотипів В19V парвовірусів. Слід використовувати стандартні зразки для перевірки вибраного підходу. Оскільки складно отримати біологічні стандартні препарати, відтворюючі деякі генотипи, відповідні плазмідні препарати або синтезовані нуклеїнові кислоти можуть бути джерелом охарактеризованих послідовностей-мішеней. Проте вони не можуть використовуватися для валідації процесів екстракції.

### 5. МЕЖА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Межею кількісного визначення є мінімальна кількість аналізованої нуклеїнової кислоти в зразку, яка може бути кількісно визначена з необхідною правильністю і прецизійністю. Межа кількісного визначення МАНК для В19V встановлюється в дослідженнях зі збіжності і внутрішньолабораторної прецизійності шляхом аналізу лімітуючих розведень. Встановлюється найменша концентрація нуклеїнових кислот-мішеней, яка кількісно визначається з підходящою прецизійністю і точністю.

## 6. ЛІНІЙНІСТЬ

Лінійність визначення — це здатність методики одержувати результати прямо пропорційні концентрації нуклеїнової кислоти. Лінійність МАНК для В19V встановлюється в дослідженнях зі збіжності і внутрішньолабораторної прецизійності тестуванням повторів розведених зразків з концентраціями, що покривають увесь кількісний діапазон. Визначають інтервал між найбільшою і найменшою концентраціями нуклеїнових кислот-мішеней, в якому результати випробування прямо пропорційні до концентрацій.

## 7. ДІАПАЗОН ЗАСТОСУВАННЯ

Діапазоном застосування аналітичної методики є інтервал між мінімальною і максимальною концентраціями нуклеїнової кислоти в зразку, для якого показано, що аналітична методика має необхідну прецизійність, правильність і лінійність. Діапазон застосування МАНК для В19V встановлюється в дослідженнях зі збіжності і внутрішньолабораторної прецизійності тестуванням повторів розведених зразків. Визначають інтервал між найбільшою і найменшою концентраціями, який може бути наведений з прийнятним ступенем прецизійності та точності.

## 8. РОБАСТНІСТЬ

Робастність — це здатність аналітичної методики не підпадати під вплив малих, але заданих (контрольованих) аналітиком змін у параметрах методу, і є показником надійності методики при її використанні в зазначених умовах. Оцінка робастності має проводитися на стадії розробки. Робастність має демонструвати вірогідність аналітичних процедур з урахуванням заданих змін параметрів методики. Для МАНК невеликі зміни параметрів методу можуть бути критичними. Проте в ході розробки методу його робастність може бути продемонстрована вивченням невеликих змін концентрацій реактивів (наприклад,  $MgCl_2$ , праймерів або dNTP). Для демонстрації робастності мають бути випробувані і визнані позитивними не менше 20 зразків В19V ДНК-негативних пулів плазми з додаванням у них ДНК В19V в порогових концентраціях і мають бути виявлені прийнятні кількісні значення.

Запобігання перехресній контамінації має бути продемонстроване шляхом точного виявлення панелі (не менше 20 зразків), поперемінно заповненої зразками негативних пулів плазми без ДНК В19V або з рівнями, нижчими порогової концентрації (10 зразків), і пулів плазми з доданими високими концентраціями ДНК В19V (10 зразків), що не менше ніж 100-кратно перевищує пороговий рівень.

## 9. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ

Для таких біологічних випробувань, як МАНК, є ймовірність виникнення специфічних проблем, які можуть вплинути як на валідацію, так і на інтерпретацію результатів. Методики випробувань мають бути чітко описані у формі стандартних операційних процедур (СОП). У них має зазначатися:

- спосіб відбору проб (тип контейнерів і т. д.);
- приготування міні-пулів (де застосовно);
- умови зберігання перед аналізом;
- точний опис умов випробування, включаючи застережні заходи, вжиті для запобігання перехресній контамінації і розпаду вірусної РНК, використовуваних реактивів і стандартних препаратів;
- точний опис використовуваного приладу;
- детальні формули розрахунків, включаючи статистичну обробку.

Як задовільна перевірка відповідності системи і надійності аналітичної процедури, коли б вона не використовувалася, може бути рекомендоване включення порогового контролю процесу (наприклад, зразок плазми з доданим у неї ДНК В19V, відповідним чином калібрований щодо Міжнародних одиниць, таких як *БСП ДНК вірусу В19 для МАНК*).

*Технічна кваліфікація:* кожній критичній частині використовуваного приладу має відповідати програма кваліфікації з інсталяції та експлуатації. Після заміни критично важливого приладу (наприклад, термоциклерів) має бути документально підтверджена продуктивність шляхом проведення паралельного випробування відносно 8 зразків пулу плазми з доданою в неї ДНК В19V до порогових концентрацій. Усі результати мають бути задовільними і мають відтворювати властивості кількісного визначення, встановлені на стадії валідації.

*Кваліфікація оператора:* відносно кожного оператора, що бере участь у випробуванні, має діяти відповідна кваліфікаційна програма. Для підтвердження відповідного рівня підготовки кожен оператор повинен провести випробування у три різні дні не менше 8 повторних зразків пулу плазми з доданою в неї ДНК В19V до порогових концентрацій (тобто загалом 24 зразки). Усі результати мають бути задовільними і відтворювати властивості кількісного визначення, встановлені на стадії валідації.

### 2.6.31. ВИПРОБУВАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ РОСЛИННИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

**Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС).** Проводять випробування, як наведено в статті (2.6.12).

**Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС).** Проводять випробування, як наведено в статті (2.6.12). Із-за природно високого числа бактерій в

## 2.6. Біологічні випробування

лікарських засобах, для яких вимоги до мікробіологічної чистоти встановлені в статті (5.1.8), при їх випробуванні може бути використаний Сабуро-декстрозний агар, що містить антибіотики.

### ВИПРОБУВАННЯ НА ОКРЕМІ ВИДИ МІКРООРГАНІЗМІВ

#### *ESCHERICHIA COLI*

##### Виявлення мікроорганізму

**Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). 10 мл підготовленого зразка або його об'єм, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять до відповідного об'єму (визначеного, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13) соєво-казеїнового бульйону, перемішують та інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

**Відбір матеріалу та пересівання.** Струшують контейнер, переносять 1 мл соєво-казеїнового бульйону в 100 мл бульйону Мак-Конки. Інкують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. Проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

**Інтерпретація результатів.** Наявність колоній на поверхні агару Мак-Конки свідчить про можливість наявності *E. coli* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні агару Мак-Конки відсутні колонії або тести ідентифікації дали негативний результат.

**Кількісна оцінка.** Напівкількісне випробування (методом найбільш імовірного числа).

**Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок в розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12), та вносять його кількості, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г та 0.001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл та 0.001 мл) випробовуваного лікарського засобу, у відповідні об'єми (визначені, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13) соєво-казеїнового бульйону, перемішують та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

**Відбір матеріалу та пересівання.** Струшують контейнери, переносять з кожного по 1 мл соєво-казеїнового бульйону в окремий контейнер, що містить 100 мл бульйону Мак-Конки. Інкують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. З кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

**Інтерпретація результатів.** Наявність колоній на поверхні агару Мак-Конки свідчить про можливість наявності *E. coli* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Відмічають найменшу кількість лікарського засобу, яка дає позитивний результат, та найбільшу кількість, яка дає негативний результат.

Імовірне число бактерій визначають за таблицею:

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу			Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	
+	+	+	більше 10 <sup>3</sup>
+	+	—	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	—	—	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
—	—	—	менше 10

#### ТОЛЕРАНТНІ ДО ЖОВЧІ ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ

**Кількісна оцінка.** Напівкількісне випробування (методом найбільш імовірного числа).

**Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок у розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12), але як розчинник використовують соєво-казеїновий бульйон. Перемішують та інкують при температурі від 20 °С до 25 °С протягом часу, достатнього для відновлення життєздатності бактерій, але недостатнього для значного збільшення їх числа (від 2 год до 3 год).

**Відбір матеріалу та пересівання.** Підготовлений зразок і/або, залежно від встановленої для даного лікарського засобу межі вмісту, 3 з 4 його розведень, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г, 0.001 г та 0.0001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл, 0.001 мл та 0.0001 мл) випробовуваного лікарського засобу, переносять в контейнери, що містять відповідні об'єми нагромаджувального бульйону Мозеля для ентеробактерій. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год. Із кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

**Інтерпретація результатів.** Наявність колоній на поверхні агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним указує на позитивний результат випробування.

Відзначають найменшу кількість лікарського засобу, яка дає позитивний результат, та найбільшу кількість, яка дає негативний результат.

Імовірне число бактерій визначають за таблицею:

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу				Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	0.0001 г або 0.0001 мл	
+	+	+	+	більше 10 <sup>4</sup>
+	+	+	-	менше 10 <sup>4</sup> , але більше 10 <sup>3</sup>
+	+	-	-	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	-	-	-	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
-	-	-	-	менше 10

## SALMONELLA

### Виявлення мікроорганізму

*Підготовка зразка та попередня інкубація.* Готують зразок, як наведено в статті (2.6.12) та вносять його об'єм, що відповідає не менше ніж 25 г або 25 мл випробовуваного лікарського засобу, в 225 мл буферно-пептонного середовища та перемішують. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

### Буферно-пептонне середовище

Калію дигідрофосфат	1.5 г
Динатрію гідрофосфат дигідрат	9.0 г
Натрію хлорид	5.0 г
Пептон (м'ясний або казеїновий)	10.0 г
Вода очищена	1000 мл

Встановлюють рН середовища так, щоб після стерилізації його значення складало  $7.0 \pm 0.2$  при температурі 25 °С. Стерилізують в автоклаві, використовуючи валідований цикл стерилізації.

*Відбір матеріалу та пересівання.* Переносять 0.1 мл буферно-пептонного середовища в 10 мл нагромаджувального бульйону Раппапорта Василядіса для *Salmonella*. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год. Проводять пересівання на поверхню дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 48 год.

*Інтерпретація результатів.* Наявність добре розвинених червоних колоній із чорними центрами або без них свідчить про можливість наявності *Salmonella* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином відсутні колонії, що описані вище, або тести ідентифікації дали негативний результат.

Рекомендовані розчини та живильні середовища наведені в статті (2.6.13).

Національна частина статті містить деякі уточнення та доповнення, які пояснюють, але суттєво не змінюють текст Європейської Фармакопеї.

## ESCHERICHIA COLI

### Виявлення мікроорганізму

*Підготовка зразка та попередня інкубація.* Якщо немає інших зазначень в окремій статті, готують зразок в розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12). 10 мл підготовленого зразка або його об'єм, що відповідає 1 г або 1 мл лікарського засобу, вносять до відповідного об'єму (визначеного, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13) соєво-казеїнового бульйону, перемішують та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

*Відбір матеріалу та пересівання.* Струшують контейнер, переносять 1 мл соєво-казеїнового бульйону в 10 мл бульйону Мак-Конки. Інкують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. Проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

*Інтерпретація результатів.* Наявність на поверхні агару Мак-Конки червоних колоній грамнегативних паличок свідчить про можливість наявності *E. coli* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестами на наявність ферменту цитохромоксидази, утилізацію цитрату та на утворення індолу. *E. coli* дає негативну реакцію на цитохромоксидазу та утилізацію цитрату та позитивну реакцію на утворення індолу. Можуть бути використані додаткові біохімічні тести.

Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні агару Мак-Конки відсутні колонії або тести ідентифікації не підтвердили наявності *E. coli*.

**Кількісна оцінка.** Напівкількісне випробування (методом найбільш імовірного числа).

*Підготовка зразка та попередня інкубація.* Готують зразок в розведенні 1:10, використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12), та вносять його кількості, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г та 0.001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл та 0.001 мл) випробовуваного лікарського засобу, у відповідні об'єми (визначені, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13) соєво-казеїнового бульйону, перемішують та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

*Відбір матеріалу та пересівання.* Струшують контейнери, переносять з кожного по 1 мл соєво-

## 2.6. Біологічні випробування

казеїнового бульйону в окремий контейнер, що містить 10 мл бульйону Мак-Конки. Інкують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 год до 48 год. З кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару Мак-Конки та інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 72 год.

**Інтерпретація результатів.** Наявність на поверхні агару Мак-Конки колоній грамнегативних паличок свідчить про можливість наявності *E. coli* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестами на наявність ферменту цитохромоксидази, утилізацію цитрату та на утворення індола. *E. coli* дає негативну реакцію на цитохромоксидазу та утилізацію цитрату та позитивну реакцію на утворення індолу. Можуть бути використані додаткові біохімічні тести. Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи. Якщо тести ідентифікації підтвердили наявність *E. coli*, результат випробування вважають позитивним.

Результат випробування вважають негативним, якщо на поверхні агару Мак-Конки відсутні колонії або тести ідентифікації не підтвердили наявність *E. coli*.

Імовірне число бактерій визначають за таблицею, враховуючи результати, які були отримані для кожної кількості лікарського засобу.

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу			Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	
+	+	+	більше 10 <sup>3</sup>
+	+	—	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	—	—	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
—	—	—	менше 10

Умовні позначки:

«+» — позитивний результат випробування;

«—» — негативний результат випробування.

### ТОЛЕРАНТНІ ДО ЖОВЧІ ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ

**Кількісна оцінка.** Напівкількісне випробування (методом найбільш імовірного числа).

**Підготовка зразка та попередня інкубація.** Готують зразок у розведенні 1:10 (або в іншому розведенні, визначеному, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13)), використовуючи не менше 1 г або 1 мл випробовуваного лікарського засобу, як наведено в статті (2.6.12), але як розчинник використовують соєво-казеїновий бульйон. Перемішують та інкують при температурі від 20 °С до 25 °С протягом часу, достатнього для відновлення життєздатності бактерій, але не достатнього для значного збільшення їх числа (від 2 год до 3 год).

**Відбір матеріалу та пересівання.** Підготовлений зразок та/або, залежно від встановленої для даного лікарського засобу межі вмісту, 3 з 4 його розведень, що містять відповідно 0.1 г, 0.01 г, 0.001 г та 0.0001 г (або 0.1 мл, 0.01 мл, 0.001 мл та 0.0001 мл) випробовуваного лікарського засобу, переносять у контейнери, що містять відповідні об'єми нагромаджувального бульйону Мозеля для ентеробактерій. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 24 год до 48 год. З кожного контейнера проводять пересівання на поверхню агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

**Інтерпретація результатів.** Наявність колоній на поверхні агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним указує на позитивний результат випробування. Відсутність колоній на поверхні агару з жовчю, глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним указує на негативний результат випробування.

Імовірне число бактерій визначають за таблицею, враховуючи результати, які були отримані для кожної кількості лікарського засобу.

Результат, отриманий для кожної кількості лікарського засобу				Імовірне число бактерій в грамі або мілілітрі лікарського засобу
0.1 г або 0.1 мл	0.01 г або 0.01 мл	0.001 г або 0.001 мл	0.0001 г або 0.0001 мл	
+	+	+	+	більше 10 <sup>4</sup>
+	+	+	—	менше 10 <sup>4</sup> , але більше 10 <sup>3</sup>
+	+	—	—	менше 10 <sup>3</sup> , але більше 10 <sup>2</sup>
+	—	—	—	менше 10 <sup>2</sup> , але більше 10
—	—	—	—	менше 10

Умовні позначки:

«+» — позитивний результат випробування;

«—» — негативний результат випробування.

### SALMONELLA

#### Виявлення мікроорганізму

**Підготовка зразка та попередня інкубація.** 25 г або 25 мл випробовуваного лікарського засобу вносять у 225 мл (або в інший об'єм, визначений, як наведено в розділі 3-4 статті (2.6.13) буферно-пептонного середовища та перемішують. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год.

**Відбір матеріалу та пересівання.** Переносять 0.1 мл буферно-пептонного середовища в 10 мл накопичувального бульйону Раппорта Василадіса для сальмонел. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 24 год. Проводять пересівання на поверхню дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином. Інкують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 год до 48 год.

*Інтерпретація результатів.* Наявність добре розвинених червоних колоній (із чорними центрами або без них) грамнегативних паличок свідчить про можливість наявності *Salmonella* в лікарському засобі, що необхідно підтвердити тестами ідентифікації, наприклад тестом на наявність ферменту цитохромоксидази та тестом на утилізацію глюкози, лактози та утворення сірководню з використанням трицукрового агару із залізом. *Salmonella* дає негативну реакцію на цитохромоксидазу. *Salmonella* на трицукровому агарі з залізом викликає зміну забарвлення середовища від червоного до жовтого в глибині агару, але не на його поверхні (позитивна реакція на утилізацію глюкози та негативна реакція на утилізацію лактози); наявність чорного забарв-

лення свідчить про утворення сірководню. Можуть бути використані додаткові біохімічні та/або серологічні тести.

Для біохімічної ідентифікації можуть бути використані готові тест-системи.

Лікарський засіб витримує випробування, якщо на поверхні дезоксихолатного агару з ксилозою та лізином відсутнє зростання колоній, описаних вище, або тести ідентифікації не підтвердили наявність *Salmonella*.

Рекомендовані розчини та живильні середовища наведені в статті (2.6.13).



## 2.7. БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

### 2.7.2. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКІВ МІКРОБІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ

Активність антибіотиків визначають шляхом порівняння ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів у результаті дії випробовуваного антибіотика і стандартного зразка у відомих концентраціях.

Стандартні зразки, використовувані для кількісного визначення, являють собою речовини, активність яких точно встановлена відповідно до міжнародного стандарту або міжнародного стандартного препарату.

Кількісне визначення треба проводити таким чином, щоб мати можливість підтвердити придатність математичної моделі, на якій ґрунтується розрахунок активності. При використанні моделі паралельних ліній дві лінії, що характеризують залежність «логарифм дози-відповідь» (або перетворена відповідь) для випробовуваного і стандартного зразків, мають бути паралельні; залежність має бути лінійною у всьому діапазоні концентрацій, використовуваних при розрахунках. Виконання цих умов треба підтвердити для заданого рівня ймовірності, звичайно  $P=0.05$ . Допускається використання інших моделей, наприклад, моделі співвідношення коефіцієнтів регресії, за умови, що їх придатність обґрунтована.

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, при кількісному визначенні активності довірчі інтервали ( $P=0.95$ ) мають становити не менше 95 % і не більше 105 % від встановленої активності.

Кількісне визначення проводять, використовуючи метод А або метод В.

#### А. МЕТОД ДИФУЗІЇ

Живильне середовище, рекомендоване для кількісного визначення, розплавляють і вносять в нього при відповідній температурі, наприклад, від 48 °С до 50 °С для вегетативних форм, певну кількість суспензії мікроорганізмів, чутливих до даного антибіотика. Кількість суспензії має бути такою, щоб забезпечувати чіткі, придатного діаметра зони пригнічення росту тест-мікроорганізму для всіх концентрацій антибіотика, використовуваних при кількісному визначенні. негайно після внесення тест-мікроорганізму живильне середовище розливають у чашки Петрі або великі прямокутні чашки так, щоб в них утворився однорідний шар завтовшки від 2 мм до 5 мм. Допускається розливати середовище у два шари, з яких інокульовано лише верхній.

Чашки треба зберігати таким чином, щоб до їх використання не спостерлося зростання або загибель

мікроорганізмів і щоб на момент використання поверхня живильного середовища була сухою.

Використовуючи зазначені в Табл. 2.7.2.-1 розчинник і буферний розчин, готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями і розчини випробовуваного антибіотика, передбачувані концентрації яких не мають істотних відмінностей від відповідних концентрацій стандартного зразка. Розчини наносять на поверхню середовища, використовуючи стерильні циліндри з порцеляни, нержавіючої сталі або іншого підходячого матеріалу, або вносять розчини в лунки, підготовані в густому живильному середовищі. У всі циліндри або лунки вносять рівні об'єми розчинів. Допускається використовувати стерильні диски з фільтрувального паперу підходячої якості, які просочують розчином стандартного зразка і випробовуваного лікарського засобу і поміщають на поверхню живильного середовища.

Для того щоб мати можливість оцінити придатність методики кількісного визначення, треба використовувати не менше трьох доз стандартного зразка і трьох відповідних доз випробовуваного антибіотика, що мають згодом ту саму активність. Бажано, щоб дози склали геометричну прогресію. При проведенні постійних кількісних визначень, для яких лінійність системи була продемонстрована на достатньо великій кількості тридозових визначень, допускається використовувати дводозовий варіант за узгодженням з компетентним уповноваженим органом. Однак в усіх сумнівних випадках треба проводити кількісне визначення тридозовим методом, як наведено вище.

На кожній чашці Петрі або прямокутній чашці розчини розміщують у відповідності до статистично прийнятного плану. Виняток становлять маленькі чашки Петрі, на яких неможливо розмістити більше шести розчинів. В цьому випадку розчини випробовуваного антибіотика і стандартного зразка чергують таким чином, щоб виключити взаємодію більш концентрованих розчинів.

Чашки інкубують при підходящій температурі близько 18 год. Для зменшення впливу різниці у часі між внесенням розчинів і для уточнення лінії регресії рекомендується використовувати попередню дифузю при кімнатній температурі або при температурі близько 4 °С тривалістю від 1 год до 4 год.

Вимірюють діаметри круглих зон пригнічення росту з точністю не менше 0.1 мм або їх площі з відповідною точністю і розраховують активність, використовуючи підходящі статистичні методи.

Число повторностей для однієї дози при кожному визначенні має бути достатнім для забезпечення потрібної точності. Може бути проведено кілька визначень, результати яких об'єднують при статистичній обробці для досягнення потрібної точності й підтвердження того, що активність випробовува-

ного антибіотика не нижча за допустиму мінімальну активність.

## В. ТУРБИДИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

У підхоже живильне середовище вносять суспензію вибраних мікроорганізмів, чутливість яких до випробовуваного антибіотика така, що забезпечує достатньо сильне пригнічення їх зростання за умов проведення випробування. Використовують певну кількість суспензії, яку підбирають таким чином, щоб одержати легко вимірювану каламутність після закінчення інкубаційного періоду тривалістю близько 4 год.

Середовище використовують негайно після внесення в нього мікроорганізмів.

Використовуючи зазначені у Табл. 2.7.2.-2 розчинник і буферний розчин, готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями і розчини випробовуваного антибіотика, передбачувані концентрації яких не мають істотних відмінностей від відповідних концентрацій стандартного зразка.

Для того щоб мати можливість оцінити придатність методики кількісного визначення, треба використовувати не менше трьох доз стандартного зразка і трьох відповідних доз випробовуваного антибіотика, що мають згодом ту саму активність. Бажано, щоб дози становили геометричну прогресію. При цьому може знадобитися з великого числа доз вибрати три послідовні дози, для яких залежність «логарифм дози — відповідь» є лінійною. Відповідні дози використовують для стандартного зразка і випробовуваного антибіотика.

Рівні об'єми кожного з розчинів вносять в однакові пробірки і додають у кожну пробірку рівні об'єми інокульованого середовища (наприклад, 1 мл розчину і 9 мл середовища).

У той самий час готують дві контрольних пробірки з інокульованим середовищем, що не містить антибіотика, в одну з яких негайно вносять 0.5 мл формальдегіду Р. Ці пробірки використовують для настройки оптичного приладу, за допомогою якого проводять вимірювання.

Усі пробірки розташовують у випадковому порядку у вигляді латинського квадрата або випадкового блока і поміщають у водяну баню або інший придатний пристрій, що дозволяє швидко довести пробірки до необхідної температури інкубації. Пробірки витримують при цій температурі від 3 год до 4 год, забезпечуючи однорідність температури і рівний час інкубації для кожної пробірки.

Після закінчення періоду інкубації зупиняють ріст мікроорганізмів, додаючи в кожну з пробірок 0.5 мл формальдегіду Р, або шляхом теплової обробки і за допомогою придатного оптичного приладу вимірюють каламутність вмісту пробірок з точністю до третьої значущої цифри. Допускається викорис-

товувати метод, що дозволяє робити вимірювання каламутності вмісту кожної пробірки після закінчення строго визначеного інкубаційного періоду, однакового для всіх пробірок.

Розраховують активність, використовуючи відповідні статистичні методи.

Залежність «логарифм дози - відповідь», перетворена або не перетворена, часто виявляється лінійною лише в дуже обмеженому діапазоні концентрацій. При розрахунках активності треба використовувати лише цей інтервал, який має включати в себе, принаймні, три послідовні дози, що необхідно для перевірки лінійності. При проведенні усталених кількісних визначень, для яких лінійність системи була продемонстрована на достатньо великій кількості тридозових визначень, допускається використовувати дводозовий варіант за узгодженістю з компетентним уповноваженим органом. Однак в усіх спірних випадках треба проводити кількісне визначення тридозовим методом, як описано вище.

Число повторностей для однієї дози при кожному визначенні має бути достатнім для забезпечення потрібної точності. Може бути проведено кілька визначень, результати яких об'єднують при статистичній обробці для досягнення потрібної точності і підтвердження того, що активність антибіотика не нижча за потрібну допустиму мінімальну активність.

*Наступний розділ має довідковий характер.*

## Тест-мікроорганізми, що рекомендуються

Нижче наведені рекомендовані тест-мікроорганізми і умови їх використання. Допускається використовувати інші мікроорганізми, якщо доведена їхня чутливість до випробовуваного антибіотика, застосовуючи придатні живильні середовища, придатні умови інкубації і значення рН. Концентрації використовуваних розчинів випробовуваного антибіотика і стандартного зразка треба підбирати таким чином, щоб за умов проведення випробування залежність між логарифмом концентрації і відповіддю була лінійною.

### Приготування інокулята.

*Bacillus cereus var. mycoides; Bacillus subtilis; Bacillus pumilus.* Суспензії спор мікроорганізмів готують таким чином.

Мікроорганізми вирощують при температурі від 35 °С до 37 °С протягом 7 діб на поверхні придатного живильного середовища, що містить 0.001 г/л марганцю(II) сульфату Р. Мікроорганізми, що вирости на поверхні живильного середовища і знаходяться переважно у формі спор, змивають за до-

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

Таблиця 2.7.2.-1.

## Кількісне визначення методом дифузії

Антибіотик	Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину	Буферний розчин (рН)	Тест-мікроорганізм	Живильне середовище і остаточне значення рН ( $\pm 0.1$ )	Температура інкубації
Амфотерицин В	Амфотерицину В ФСЗ для кількісного визначення мікробіологічним методом А	Диметилсульфоксид Р	рН 10.5 (0.2 М)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 IP 1432-83	F — рН 6.1	35 °С - 37 °С
Бацитрацину цинкова сіль	Бацитрацину цинкової солі ФСЗ	0.01 М кислота хлористоводнева	рН 7.0 (0.05 М)	<i>Micrococcus flavus</i> NCTC 7743 CIP 53.160 ATCC 10240	A — рН 7.0	35 °С - 39 °С
Блеоміцину сульфат	Блеоміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 6.8 (0.1 М)	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	G — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Ванкоміцину гідрохлорид	Ванкоміцину гідрохлориду ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52.62 ATCC 6633	A — рН 8.0	37 °С - 39 °С
Гентаміцину сульфат	Гентаміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18 <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCIB 8853 CIP 68.21 ATCC 12228	A — рН 7.9  A — рН 7.9	35 °С - 39 °С  35 °С - 39 °С
Канаміцину моносульфат	Канаміцину моносульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A — р 7.9	30 °С - 37 °С
Канаміцину сульфат кислий				<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	A — р 7.9	35 °С - 39 °С
Колістину сульфат	Колістину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 6.0 (0.05 М)	<i>Bordetella bronchiseptica</i> NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 <i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	B — рН 7.3	35 °С - 39 °С
Неоміцину сульфат	Неоміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	E — рН 7.9  E — рН 7.9	30 °С - 37 °С  30 °С - 37 °С
Нетилміцину сульфат	Нетилміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 $\pm$ 0.1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P CIP 53.156	A — рН 7.9	32 °С - 35 °С
Ністатин	Ністатину ФСЗ	Диметилформамід Р	рН 6.0 (0.05 М), що містить 5 % (об/об) диметилформаміду Р	<i>Candida tropicalis</i> CIP 1433-83 NCYC 1393 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 87 CIP 1432-83 ATCC 9763	F — рН 6.0  F — рН 6.0	30 °С - 37 °С  30 °С - 32 °С

Антибіотик	Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину	Буферний розчин (рН)	Тест-мікроорганізм	Живильне середовище і остаточне значення рН ( $\pm 0.1$ )	Температура інкубації
Рифаміцину натрієва сіль	Рифаміцину натрієвої солі ФСЗ	Метанол Р	рН 7.0 (0.05 М)	<i>Micrococcus flavus</i> NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	А — рН 6.6	35 °С - 39 °С
Спіраміцин	Спіраміцину ФСЗ	Метанол Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	А — рН 7.9	30 °С - 32 °С
Стрептоміцину сульфат	Стрептоміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 1.83	А — рН 7.9	30 °С - 37 °С
				<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	А — рН 7.9	30 °С - 37 °С
Тилозин для ветеринарії	Тилозину ФСЗ	2.5 % розчин об/об метанолу Р у 0.1 М фосфатному буферному розчині рН 7.0 Р	Суміш метанолу Р і 0.1 М фосфатного буферного розчину рН 7.0 Р у співвідношенні 40:60 (об/об)	<i>Micrococcus flavus</i> NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	А — рН 8.0	32 °С - 35 °С
Тилозину тартрат для ветеринарії	Тилозину ФСЗ					
▼ Тейкопланін ▲	Тейкопланіну ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Н — рН 7.8-8.0	35 °С - 37 °С
Фраміцетину сульфат	Фраміцетину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0 (0.05 М)	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Е — рН 7.9	30 °С - 37 °С
				<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Е — рН 7.9	30 °С - 37 °С

помогою стерильної води Р. Одержану суспензію спор прогрівають протягом 30 хв при температурі 70 °С і розводять до придатної концентрації спор, звичайно від  $10 \times 10^6$  до  $100 \times 10^6$  спор в 1 мл. Суспензія спор може зберігатися протягом тривалого часу при температурі не вище 4 °С.

Може бути використаний інший спосіб приготування суспензії спор. Мікроорганізми вирощують на середовищі С при температурі 26 °С від 4 діб до 6 діб, потім, дотримуючись правила асептики, додають 0.001 г/л марганцю(II) сульфату Р і продовжують інкубацію протягом 48 год. Мікроскопічно підтверджують утворення спор у достатній кількості (близько 80 %) і центрифугують суспензію. Одержаний осад повторно суспендують у стерильній воді Р, створюючи концентрацію від  $10 \times 10^6$  до  $100 \times 10^6$  спор в 1 мл, і прогрівають протягом 30 хв при температурі 70 °С. Суспензію треба зберігати при температурі не вище 4 °С.

*Bordetella bronchiseptica*. Тест-мікроорганізми вирощують на поверхні живильного середовища В при температурі від 35 °С до 37 °С від 16 год до 18 год. Мікроорганізми, що виростили на поверхні живильного середовища, змивають стерильною водою Р і розводять до одержання придатної каламутності.

*Staphylococcus aureus; Klebsiella pneumoniae; Escherichia coli; Micrococcus flavus; Staphylococcus epidermidis*. Готують, як описано вище для *B. bronchiseptica*, використовуючи середовище А і підбираючи каламутність, що забезпечує задовільну залежність «доза - відповідь» при проведенні турбідиметричного кількісного визначення або дає чіткі зони пригнічення росту придатного діаметра при проведенні кількісного визначення методом дифузії.

*Saccharomyces cerevisiae; Candida tropicalis*. Мікроорганізми вирощують на поверхні середовища F при температурі від 30 °С до 37 °С протягом 24 год. Мікроорганізми, що виростили на поверхні середовища, змивають стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду Р і розводять до придатної каламутності тим самим розчином.

#### Буферні розчини.

Буферні розчини із значеннями рН від 5.8 до 8.0 готують шляхом змішування 50.0 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату з зазначеною у Табл. 2.7.2.-3 кількістю 0.2 М розчину натрію гідроксиду. Об'єм доводять до 200.0 мл свіжоприготованою методом дистиляції водою Р.

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

Таблиця 2.7.2.-2

Кількісне визначення турбідиметричним методом

Антибіотик	Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину	Буферний розчин (рН)	Тест-мікроорганізм	Живильне середовище і остаточне значення рН ( $\pm 0.1$ )	Температура інкубації
Ванкоміцину гідрохлорид	Ванкоміцину гідрохлориду ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P CIP 53.156	С — рН 7.0	37 °С - 39 °С
Гентаміцину сульфат	Гентаміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 7.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Грамїцидин	Грамїцидину ФСЗ	Метанол Р	рН 7.0 (для запобігання адсорбції при розведенні може бути додана поверхнево-активна речовина, наприклад, 0.1 мг/мл полісорбату 80 Р)	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Канаміцину моносульфат Канаміцину сульфат кислий	Канаміцину моносульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Колістину сульфат Колістинметансульфонат натрію	Колістину сульфату ФСЗ Колістинметансульфонату натрію ФСЗ	Вода Р	рН 7.0	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Неоміцину сульфат	Неоміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Рифаміцину натрієва сіль	Рифаміцину натрієвої солі ФСЗ	Метанол Р	рН 7.0	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Спіраміцин	Спіраміцину ФСЗ	Метанол Р	рН 7.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Стрептоміцину сульфат	Стрептоміцину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С
Тилозин для ветеринарії Тилозину гартрат для ветеринарії	Тилозину ФСЗ	2.5 % розчин об/об метанолу Р у 0.1 М фосфатному буферному розчині рН 7.0 Р	рН 7.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571 ATCC 9144 CIP 53.154	С — рН 7.0	37 °С
Тіотрицин	Тіотрицину ФСЗ	Спирт Р	Спирт Р	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 ATCC 6538 P CIP 53.156 ATCC 9144	С — рН 7.0	37 °С
Фраміцетину сульфат	Фраміцетину сульфату ФСЗ	Вода Р	рН 8.0	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С — рН 7.0	35 °С - 37 °С

Буферні розчини використовують для кількісного визначення всіх антибіотиків, перелічених у Таблиці 2.7.2.-1, за винятком блеомицину сульфату. Для приготування буферного розчину (рН 6.8), необхідного для кількісного визначення блеомицину сульфату, 6.4 г *калію дигідрофосфату Рі* і 18.9 г *динатрію гідрофосфату Р* розчиняють у воді Р і доводять об'єм до 1000 мл.

Таблиця 2.7.2. -3

рН	Об'єм 0.2 М розчину натрію гідроксиду, у мілілітрах
5.8	3.72
6.0	5.70
6.2	8.60
6.4	12.60
6.6	17.80
6.8	23.65
7.0	29.63
7.2	35.00
7.4	39.50
7.6	42.80
7.8	45.20
8.0	46.80

**Живильні середовища.**

Для кількісного визначення антибіотиків використовують живильні середовища, наведені нижче, або еквівалентні їм.

**Живильне середовище А**

Пептон	6 г
Панкреатичний гідролізат казеїну	4 г
Яловичий екстракт	1.5 г
Дріжджовий екстракт	3 г
Глюкози моногідрат	1 г
Агар	15 г
Вода до	1000 мл

**Живильне середовище В**

Панкреатичний гідролізат казеїну	17 г
Папаїновий гідролізат соєвих бобів	3 г
Натрію хлорид	5 г
Дикалію гідрофосфат	2.5 г
Глюкози моногідрат	2.5 г
Агар	15 г
Полісорбат-80	10 г
Вода до	1000 мл

Полісорбат-80 додають до гарячого розчину решти інгредієнтів після кип'ятіння і безпосередньо перед доведенням розчину до потрібного об'єму.

**Живильне середовище С**

Пептон	6 г
Яловичий екстракт	1.5 г
Дріжджовий екстракт	3 г

Натрію хлорид	3.5 г
Глюкози моногідрат	1 г
Дикалію гідрофосфат	3.68 г
Натрію гідрофосфат	1.32 г
Вода до	1000 мл

**Живильне середовище D**

Екстракт серця	1.5 г
Дріжджовий екстракт	1.5 г
Казеїн-пептон	5 г
Глюкози моногідрат	1 г
Натрію хлорид	3.5 г
Дикалію гідрофосфат	3.68 г
Натрію гідрофосфат	1.32 г
Натрію нітрат	2 г
Вода до	1000 мл

**Живильне середовище Е**

Пептон	5 г
М'ясний екстракт	3 г
Динатрію гідрофосфат додекагідрат	26.9 г
Агар	10 г
Вода до	1000 мл

Динатрію гідрофосфат додають у вигляді стерильного розчину після стерилізації середовища.

**Живильне середовище F**

Пептон	9.4 г
Дріжджовий екстракт	4.7 г
Яловичий екстракт	2.4 г
Натрію хлорид	10.0 г
Глюкози моногідрат	10.0 г
Агар	23.5 г
Вода до	1000 мл

**Живильне середовище G**

Гліцерин	10 г
Пептон	10 г
М'ясний екстракт	10 г
Натрію хлорид	3 г
Агар	15 г
Вода до	1000 мл

рН після стерилізації  $7.0 \pm 0.1$

**Живильне середовище H**

Пептон	5 г
Агар	15 г
Яловичий екстракт	3 г
Вода до	1000 мл

доведення до рН 7.8-8.0 0.1 М натрію гідроксидом ▲

N

Активність антибіотиків виражають в одиницях дії (ОД) або мікрограмах. Для більшості антибіотиків 1 ОД відповідає 1 мкг активної речовини.

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

### А. Метод дифузії

Кількісне визначення антибіотиків методом дифузії може також проводитися за умов, зазначених у Таблиці 2.7.2.-1.

Живильні середовища, що рекомендуються для кількісного визначення, розплавляють і розливають у чашки Петрі в один або два шари. Для нижнього шару використовують неінокульовані живильні середовища, для верхнього або одного шару - густе живильне середовище, інокульоване тест-мікроорганізмом. Температура розплавленого живильного середовища, в яке вносять тест-мікроорганізми, має становити від 48 °С до 50 °С для вегетативних клітин і від 65 °С до 70 °С при використанні суспензії спор.

Основні розчини стандартних і випробовуваних зразків готують у стерильних розчинниках. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, концентрація основного розчину має становити близько 1 мг/мл.

Робочі розчини стандартного зразка і випробовуваного антибіотика готують шляхом розведення основного розчину стерильним розчинником. Концентрації робочих розчинів, що містять малу, середню і велику дози мають становити геометричну прогресію. Співвідношення, що рекомендується 1:2:4. Концентрація, що рекомендується, робочих розчинів, які містять середню дозу (контрольна концентрація), наведена у Таблиці 2.7.2.-4. Допускається при необхідності зміна контрольної концентрації за умови, що залежність «логарифм дози - відповідь» буде лінійною у використовуваному діапазоні концентрацій.

При використанні для кількісного визначення чашок Петрі на кожній чашці розміщують 6 циліндрів або готують 6 лунок. Діаметри усіх циліндрів або лунок мають відрізнятись не більше як на  $\pm 0.1$  мм.

Робочі розчини стандартного зразка і випробовуваного антибіотика вносять у циліндри або лунки однієї чашки Петрі так, щоб розчини з однаковими концентраціями не межували один з одним. При внесенні розчинів спочатку вносять усі розчини в лунки або циліндри однієї чашки Петрі, потім вносять розчини в лунки або циліндри наступної чашки і т.д.

Кількість чашок Петрі, використовуваних в одному визначенні, має бути достатньою для забезпечення статистичної вірогідності результатів, але не менше 6 чашок.

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, тривалість інкубації має становити від 16 год до 18 год.

Буферні розчини наведені у Таблиці 2.7.2.-3.

Глюкозу додають у розплавлене живильне середовище у вигляді стерильного 40 % розчину.

### Тест-мікроорганізми, що рекомендуються

#### Приготування інокулята.

*Bordetella bronchiseptica*. Для вирощування тест-мікроорганізму може бути використане живильне середовище № 1 (рН 7.0-7.2). Тривалість інкубації на середовищі № 1 становить від 30 год до 36 год.

*Staphylococcus aureus*. Для вирощування тест-мікроорганізму може бути використане живильне середовище № 1 (рН 7.0-7.2). Тривалість інкубації на середовищі № 1 становить від 18 год до 20 год.

*Bacillus cereus var. mycoides; Bacillus pumilus*. Для приготування суспензії спор може бути використаний спосіб, наведений нижче. Тест-мікроорганізми вирощують на живильному середовищі № 1. Значення рН середовища для вирощування *B. cereus var. mycoides* НВ і *B. pumilus* NCTC 8241 має становити від 7.0 до 7.2, значення рН середовища для вирощування *B. cereus var. mycoides* 537 - від 7.8 до 8.0. Посіви інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С від 18 год до 20 год. Мікроорганізми, що виростили на поверхні живильного середовища, змивають за допомогою стерильного розчину 9 г/л натрію хлориду (від 5 мл до 10 мл) і засівають декілька матраців з 300 мл живильного середовища № 3 зі скошеною поверхнею. Значення рН середовища для вирощування *B. cereus var. mycoides* 537 і *B. pumilus* NCTC 8241 має становити від 6.0 до 6.2, значення рН середовища для вирощування *B. cereus var. mycoides* НВ — від 7.8 до 8.0. Посіви інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С від 5 діб до 7 діб. У процесі вирощування проводять мікроскопічний контроль культури. Кількість спор, спостережувана при мікроскопії, має становити не менше 80 % від загальної кількості клітин. Культуру, що містить достатню кількість спор, змивають з поверхні живильного середовища стерильною водою очищеною. Одержану суспензію спор прогрівають при температурі від 60 °С до 70 °С протягом 30 хв. Потім промивають стерильною водою очищеною при центрифугуванні до одержання прозорої надосадової рідини. Промиту завись спор знову прогрівають протягом 30 хв при температурі від 60 °С до 70 °С. Завись спор зберігають у скляних пробірках при температурі від 4 °С до 10 °С і використовують доти, доки інтенсивність росту і чіткість зон при кількісному визначенні задовольняють поставлені вимоги.

*Candida utilis* ЛІА-01. Тест-мікроорганізми вирощують у пробірках зі скошеним живильним середовищем № 2 протягом 48 год при температурі від 29 °С до 31 °С. Після закінчення періоду інкубації культуру змивають з поверхні живильного середовища стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду і засівають матрац зі скошеною поверхнею. Посіви інкубують протягом 48 год, після закінчення періоду інкубації змивають 50 мл стерильного розчину 9 г/л

Таблиця 2.7.2.-4.

Умови, що рекомендуються, кількісного визначення антибіотиків методом дифузії.

Антибіотик/Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину/ Термін зберігання основного розчину стандартного зразка при температурі від 4 °С до 10 °С	Розчинник для приготування робочих розчинів; контрольна концентрація	Тест-мікроорганізм; посівна доза	Живильне середовище і остаточне значення рН (0.1)		Кількість живильного середовища на 1 чашку Петрі (мл) <sup>1</sup>	
				Нижній шар <sup>2</sup>	Верхній шар	Нижній шар	Верхній шар
Амфотерицин В/ <i>Амфотерицину В ФСЗ</i> для кількісного визначення мікробіологічним методом▲	Диметилсульфоксид/ 1 доба	Буферний розчин <sup>3</sup> рН 7.0, термін придатності при кімнатній температурі не більше 30 хв; 1 мкг/мл	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01; 3 мл робочої завіси на 100 мл середовища	—	№ 11 + 0.1 % глюкози <sup>4</sup>	—	15
Геліоміцин/ <i>Геліоміцину ФСЗ</i>	0.1 М розчин натрію гідроксиду до концентрації геліоміцину 1 мг в 5 мл/ 10 діб	0.1 М розчин натрію гідроксиду; 4 мкг/мл	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; 10 <sup>8</sup> спор/мл	№ 12	№ 12		15
Гентаміцину сульфат/ <i>Гентаміцину сульфату ФСЗ</i>	Буферний розчин рН 8.0/ 14 діб	Буферний розчин рН 8.0; 2 мкг/мл	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241; 5×10 <sup>7</sup> спор/мл	№ 6	№ 6	20	5
Граміцидин С/ <i>Граміцидину С ФСЗ</i>	96 % спирт / 30 діб	Вода очищена; 100 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycooides</i> 537; 8×10 <sup>6</sup> спор/мл	—	№ 9	—	10
Дактиноміцин/ <i>Дактиноміцину ФСЗ</i>	Вода очищена (витримують при температурі від 4 °С до 10 °С до повного розчинення)/ 15 діб	Буферний розчин рН 8.0; 4 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycooides</i> НВ; 2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 10	—	10
Дигідрострептоміцину сульфат / <i>Дигідрострептоміцину сульфату ФСЗ</i>	Буферний розчин рН 6.2/ 30 діб	Буферний розчин рН 8.0; 2 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycooides</i> 537; 2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 6	—	10
Канаміцин/ <i>Канаміцину моносульфату ФСЗ</i>	Вода очищена / 30 діб	Буферний розчин рН 8.0; 10 мкг/мл	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241; 4×10 <sup>7</sup> спор/мл	№ 5 рН 7.9	№ 5 рН 7.9	15	5
Карміноміцин/ <i>Карміноміцину гідрохлориду ФСЗ</i>	Вода очищена/ 10 діб	Буферний розчин рН 8.0; 15 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycooides</i> 537; 10 <sup>8</sup> спор/мл	—	№ 3 рН 7.9	—	15



## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

Антибіотик/Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину/ Термін зберігання основного розчину стандартного зразка при температурі від 4 °С до 10 °С	Розчинник для приготування робочих розчинів; контрольна концентрація	Тест-мікроорганізм; посівна доза	Живильне середовище і остаточне значення рН (0.1)		Кількість живильного середовища на 1 чашку Петрі (мл) <sup>1</sup>	
				Нижній шар <sup>2</sup>	Верхній шар	Нижній шар	Верхній шар
Леворин/ <i>Леворину</i> ФСЗ	Диметилсульфоксид/ 3 доби	Диметилсульфоксид до концентрації леворину 100 мкг/мл, потім у буферному розчині рН 7.0. Термін зберігання при кімнатній температурі не більше 30 хв;  0.5 мкг/мл	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01;  от 2 мл до 2.5 мл робочої зависі на 100 мл середовища	—	№ 11 + 1 % глюкози	—	15
Метациклін/ <i>Метацикліну гідрохлориду</i> ФСЗ	0.01 М розчин кислоти хлористоводневої / 7 діб	Буферний розчин рН 6.0;  0.5 мкг/мл	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>Л<sub>2</sub></i>  3×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 11 + 1 % глюкози	—	15
Мікогептин/ <i>Мікогептину</i> ФСЗ	Диметилсульфоксид/ 3 доби (не більше 4-5 год при кімнатній температурі)	Диметилсульфоксид до концентрації 50 мкг/мл, потім буферний розчин рН 8.0 (Термін придатності при кімнатній температурі не більше 30 хвилин);  1 мкг/мл	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01;  от 2.5 мл до 3.0 мл робочої зависі на 100 мл середовища	—	№ 11 + 1 % глюкози	—	15
Мономіцин/ <i>Мономіцину</i> ФСЗ	Вода очищена/ 30 діб	Розчин калію хлориду 3 %;  2 мкг/мл	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537;  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 6	—	10
Неоміцину сульфат / <i>Неоміцину сульфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 8.0 / 30 діб	Буферний розчин рН 8.0;  4 мкг/мл	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> 537;  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	№ 6	№ 6	20	5
Ністатин / <i>Ністатину</i> ФСЗ	Диметилформамід / 3 доби	Буферний розчин рН 6.0;  20 ОД/мл	<i>Candida utilis</i> ЛИА-01;  від 3 мл до 3.5 мл робочої зависі на 100 мл середовища	—	№ 11 + 1 % глюкози	—	15
Оксацилін/ <i>Оксациліну натрієвої солі</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 7.0/ 3 доби	Буферний розчин рН 7.0;  4 мкг/мл	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P;  4×10 <sup>7</sup> клітин на 1 мл	№ 8 рН 6.9	№ 5 рН 6.9 + 0.1 % глюкози	10	5
Олеандоміцин/ <i>Олеандоміцину фосфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 6.2/ 7 діб	Буферний розчин рН 8.0;  4 мкг/мл	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> НВ;  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 6	—	10

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

Антибіотик/Стандартний зразок	Розчинник для приготування основного розчину/ Термін зберігання основного розчину стандартного зразка при температурі від 4 °С до 10 °С	Розчинник для приготування робочих розчинів; контрольна концентрація	Тест-мікроорганізм; посівна доза	Живильне середовище і остаточне значення рН (0.1)		Кількість живильного середовища на 1 чашку Петрі (мл) <sup>1</sup>	
				Нижній шар <sup>2</sup>	Верхній шар	Нижній шар	Верхній шар
Оливоміцин/ <i>Оливоміцину кислоти</i> ФСЗ	Стандартний зразок у 96 % спирті до концентрації оливоміцину 5 мг/мл, потім буферний розчин рН 7.0; випробовуваний зразок у воді очищеній/  14 діб	Буферний розчин рН 7.0;  2 мкг/мл	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633;  10 <sup>7</sup> спор/мл	№ 8 рН 6.9	№ 13	10	5
Поліміксин В / <i>Поліміксину В сульфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 6.0/  14 діб	Буферний розчин рН 6.0;  100 ОД/мл	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617;  від 4×10 <sup>7</sup> до 6×10 <sup>7</sup> клітин на 1 мл	—	№ 7 рН 7.1	—	10
Поліміксин М/ <i>Поліміксину М сульфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 6.0/  14 діб	Буферний розчин рН 6.0;  100 ОД/мл	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617;  від 4×10 <sup>7</sup> до 6×10 <sup>7</sup> клітин на 1 мл	—	№ 7 рН 7.1	—	10
Рубоміцин/ <i>Рубоміцину гідрохлориду</i> ФСЗ	Вода очищена/  10 діб	Буферний розчин рН 8.0;  20 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i> 537;  10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 3 рН 7.9	—	15
Сизоміцин/ <i>Сизоміцину сульфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 8.0/  14 діб	Буферний розчин рН 8.0;  2 мкг/мл	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241;  5×10 <sup>7</sup> спор/мл	№ 8 рН 7.9	№ 5 рН 7.9	20	5
Стрептоміцин / <i>Стрептоміцину сульфату</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 6.2/  30 діб	Буферний розчин рН 8.0;  2 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i> 537;  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 6	—	10
Феноксиметилпеніцилін/ <i>Феноксиметилпеніциліну</i> ФСЗ	Буферний розчин рН 7.0/  7 діб	Буферний розчин рН 7.0/  1 ОД/мл	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P/  4×10 <sup>7</sup> клітин на 1 мл	№ 8 рН 6.9	№ 5 рН 6.9 + 0.1 % глюкози	10	5
Флориміцин/ <i>Флориміцину сульфату</i> ФСЗ	Вода очищена/  7 діб	Буферний розчин рН 6.2/  10 мкг/мл	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633/  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 5 рН 7.9	—	10
Еритроміцин / <i>Еритроміцину</i> ФСЗ	1 мл 96 % спирту на 10 мг наважки, потім буферний розчин рН 8.0 до 1000 ОД/мл /  7 діб	Буферний розчин рН 8.0 /  2 мкг/мл	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i> НВ/  2×10 <sup>7</sup> спор/мл	—	№ 6	—	10

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

натрію хлориду. Готують робочу завісь, каламутність якої має бути такою, щоб при розведенні її у 30 разів стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду оптична густина становила від 0.22 до 0.23. Для визначення каламутності суспензії використовують нефелометр з нейтральним світлофільтром і кювети з товщиною шару 3 мм. Робоча завісь може зберігатися протягом 30 діб.

### Живильні середовища

Для кількісного визначення антибіотиків у відповідності до рекомендацій Табл. 2.7.2.-4 можуть бути використані живильні середовища, наведені нижче, або їм еквівалентні.

#### Середовище № 1

М'ясо-пептонний бульйон	1000 мл
Агар	20 г

#### Середовище № 2

М'ясо-пептонний бульйон	1000 мл
Агар	17 г
Глюкоза	10 г
Натрію хлорид	5 г

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 7.0 до 7.2.

#### Середовище № 3

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	25 г
Вода очищена до	1000 мл

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 30 мг% до 35 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 4

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	10-15 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 6.8 до 7.0.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 130 мг% до 140 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 5

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	10-12 г
Динатрію гідрофосфат	3 г
Вода очищена до	1000 мл

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 130 мг% до 140 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 6

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	15 г
Динатрію гідрофосфат	3 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 7.8 до 8.0.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 30 мг% до 35 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 7

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	10-15 г
Калію фосфат однозаміщений	25 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 6.0 до 6.2.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 130 мг% до 140 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 8

Агар	15-20 г
Динатрію гідрофосфат	3 г
Вода очищена до	1000 мл

#### Середовище № 9

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	20 г
Калію хлорид	25 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 7.0 до 7.2.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 30 мг% до 35 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 10

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	15 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 7.8 до 8.0.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 30 мг% до 35 мг% амінного азоту.

#### Середовище № 11

Агар	18-20 г
Динатрію гідрофосфат	5 г
Натрію хлорид	20 г
Калію хлорид	20 г
Амонію цитрат	5 г
Вода очищена	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 5.8 до 6.0.

#### Середовище № 12

Агар	18 г
Глюкоза	5 г
Динатрію гідрофосфат	15 г
Сечовина	2 г
Амонію хлорид	2 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити від 7.8 до 8.0.

#### Середовище № 13

Ферментативний гідролізат біомаси мікроорганізмів без оболонки	5 г
Агар	15-20 г
Глюкоза	5 г
Натрію хлорид	30 г
Вода очищена до	1000 мл

Значення рН середовища після стерилізації має становити 6.8 до 7.0.

При приготуванні живильного середовища замість ферментативного гідролізату біомаси мікроорганізмів без оболонки може бути використаний панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгером) глибокого розщеплення. Середовище має містити від 130 мг% до 140 мг% амінного азоту.

При приготуванні живильних середовищ на основі сухого ферментативного гідролізату мікроорганізмів без оболонки інгредієнти складу вносять у воду очищену, додають замочений заздалегідь агар і нагрівають до повного його розплавлення. Установлюють рН таким чином, щоб після стерилізації його значення становило величину, зазначену вище для кожного живильного середовища, і у Таблиці 2.7.2.-4. При необхідності фільтрують крізь марлевий фільтр. Стерилізують у паровому стерилізаторі при температурі 121 °С протягом 15 хв.

Примітка: Кількість агару у живильних середовищах зазначена для випробування з використанням циліндрів. При проведенні випробування з використанням лунок кількість агару збільшують до 20-25 г. Допускається зміна кількості агару в середовищах у залежності від його якості.

#### 2.7.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ

Антикоагулянтну активність гепарину визначають *in vitro* шляхом порівняння його здатності у заданих умовах затримувати згортання рекальцинованої цитратної овечої плазми крові з аналогічною здатністю стандартного препарату гепарину, каліброваного у Міжнародних одиницях (МО).

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з певної кількості ліофілізованої натрієвої солі гепарину, отриманої зі слизових оболонок кишечника свиней. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*БСП гепарину натрію*, у МО, калібрують відповідно міжнародного стандарту із використанням одного з наведених нижче методів кількісного визначення.

Кількісне визначення виконують одним із таких методів встановлення початку згортання. Для визначення використовують пробірки та інше обладнання, відповідно до вибраного методу:

- візуальне спостереження, переважно у відбитому світлі на чорному матовому тлі;
- спектрофотометрична реєстрація зміни оптичної густини за довжини хвилі близько 600 нм;
- візуальна фіксація зміни плинності шляхом обережного нахилу пробірок (проводиться вручну);
- механічний запис зміни плинності, що визначається при перемішуванні, із дотриманням запобіжних засобів, спрямованих на мінімізацію збурювання розчину на початковій стадії згортання.

#### МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Наведені в тексті об'єми є прикладом, і за умови дотримання співвідношень між різними об'ємами

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

можуть бути адаптовані до апаратури, що використовується.

БСП *гепарину натрію* розводять розчином 9 г/л *натрію хлориду Р* до отримання точно відомої кількості МО у мілілітрі, аналогічно готують розчин випробовуваного препарату, для якого передбачена така сама активність. Із кожного одержаного розчину готують ряд розведень у геометричній прогресії, використовуючи розчин 9 г/л *натрію хлориду Р*, так, щоб час згортання для нижчої концентрації не менше ніж в 1.5 рази перевищував час згортання у рекальцинованій плазмі, а час згортання для вищої концентрації мав значення, що дають можливість побудувати задовільну криву «доза-ефект». Крива «доза-ефект» визначається в ході попереднього випробування.

Поміщають дванадцять пробірок у льодяну баню. Позначають їх таким чином: два ряди ( $T_1, T_2$  і  $T_3$ ) для розведень випробовуваного препарату та два ряди ( $S_1, S_2$  і  $S_3$ ) для розведень стандартного препарату. У кожну із пробірок додають 1.0 мл розмороженої *плазми субстрату Р1* та 1.0 мл відповідних розведень випробовуваного або стандартного препаратів.

Після кожного додавання розчин перемішують, не допускаючи утворення бульбашок. Для подальших маніпуляцій пробірки відбирають у такому порядку:  $S_1, S_2, S_3, T_1, T_2, T_3$ . Кожну із пробірок поміщають у водяну баню, нагріту до температури 37 °С, та відстоюють протягом 15 хв. Додають до кожної з пробірок 1.0 мл підходячого активатора часткового тромбoplastинового часу (АРТТ), що містить фосфоліпід та контактний активатор, у такому співвідношенні, щоб тривалість рекальцифікації плазми не перевищувала 60 с. Рівно через 2 хв додають 1.0 мл попередньо нагрітого до 37 °С розчину 3.7 г/л *кальцію хлориду Р*. Реєструють як час згортання інтервал, у секундах, між останнім додаванням розчину та початком згортання, що визначають за допомогою обраної техніки. Аналогічним чином визначають час згортання на початку та наприкінці випробування, використовуючи замість одного з розведень гепарину 1.0 мл розчину 9 г/л *натрію хлориду Р*. Два одержаних значення не мають істотно відрізнитися. Час згортання переводять у логарифми; для пробірок, що дублюються, використовують середні значення. Процедуру повторюють із свіжими розведеннями, проводячи інкубацію у такому порядку:  $T_1, T_2, T_3, S_1, S_2, S_3$ . Результати обчислюють із використанням звичайних статистичних методів.

Проводять не менше трьох незалежних визначень. Для кожного визначення готують свіжі розчини стандартного та випробовуваного препаратів і використовують нову свіжорозморожену порцію *плазми субстрату Р1*.

Активність випробовуваного препарату обчислюють шляхом об'єднання результатів усіх визначень з використанням звичайних статистичних методів.

Якщо відхилення, викликане відмінностями між результатами визначень, є значущим при  $P = 0.01$ ,

об'єднана оцінка активності може бути отримана шляхом обчислення незважених середніх значень оцінок активності.

### 2.7.6. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ (АДСОРБОВАНОЇ)

Активність вакцини для профілактики дифтерії визначають введенням вакцини мурчакам після їх провокаційного зараження дифтерійним токсином (метод А або В) або визначенням титру антитіл до дифтерійного токсину або анатоксину в сироватці мурчаків (метод С). У всіх випадках активність вакцини розраховують відносно стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО).

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з певної кількості дифтерійного анатоксину, адсорбованого на алюмінію гідроксид. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*БСП вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої)* придатний для застосування як стандартний препарат

Підбір методу визначення вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) залежить від призначення. Метод А або В використовують:

1. при розробці вакцин для кількісного визначення виготовлених партій для валідації виробництва;
2. якщо необхідно провести повторну валідацію, через значні зміни виробничих процесів.

Метод А або В можуть також використовуватися для рутинного кількісного визначення партій вакцин, але з метою збереження тварин, по можливості слід застосовуватися метод С.

Метод С може застосовуватися, крім випадків зазначених вище в пунктах 1 та 2, після перевірки придатності методу для продукту. Для цих цілей відповідну кількість партій (звичайно 3) аналізують методом С та методами А або В. В тих випадках, коли різні вакцини (моновалентні або комбіновані) готують з дифтерійного анатоксину одного походження та з порівняним рівнем (що відображено в Лf/мл) того самого дифтерійного анатоксину, придатність, показана для комбінації з найбільшою кількістю компонентів може вважатися дійсною для комбінації з меншою кількістю компонентів та для моновалентних вакцин. Будь-які комбінації, що містять такий компонент як цільноклітинний кашлюк або вакцину для профілактики інфекцій викликаних *Hemophilus influenzae* типу b (кон'югована) з дифтерійним анатоксином або CRM 197 дифтерійним білком-носієм в одному флаконі, мають оцінюватися окремо.

Для комбінацій, що містять дифтерійний та правцевий компоненти, серологічний аналіз (метод С) мо-

же проводиться на тій же групі тварин, досліджених при серологічному аналізі вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8), якщо підтверджено, що звичайні умови імунізації для компонентів дифтерії та правця (наприклад, дози, тривалість) вірогідні для комбінованих вакцин.

При розробці кількісних визначень, наведених нижче, використовують численні розведення випробовуваного та стандартного препарату. Коли аналітик має достатній досвід роботи з методом для даної вакцини, можливе застосування спрощеної моделі, такої як одне розведення випробовуваного та стандартного препарату. Така модель дозволяє аналітику встановити, чи є активність випробовуваного препарату значно вище мінімально необхідної, але не дає інформації з лінійності, паралельності та криву доза-відповіді. Спрощена модель дозволяє значно зменшити кількість необхідних тварин, що відповідає положенню Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

Якщо при кількісному визначенні використовують одне розведення, час від часу слід перевіряти відтворюваність виробництва та випробування відповідними індикаторами і періодично, наприклад, кожні 2 роки, проводити повний аналіз із численними розведеннями. Для серологічного аналізу відповідними індикаторами для контролю відтворюваності випробування є:

- середнє та стандартне відхилення відносних титрів анатоксину або число зразків сироватки, отриманих після застосування фіксованих доз стандартного препарату вакцини;
- титр антитоксину або число контрольних прогонів (позитивні та негативні зразки сироватки);
- співвідношення титрів антитоксину або числа позитивних контрольних сироваток на зразки сироваток, відповідних стандартній вакцині.

## МЕТОД А: ПРОВОКАЦІЙНИЙ ПІДШКІРНИЙ ТЕСТ У МУРЧАКІВ

### ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБОВУВАНИХ ТВАРИН

У випробуванні використовують здорових, білих мурчаків однієї лінії та розміру, що підходять для встановленої кількості ділянок провокаційного зараження, різниця маси тіла між самою важкою та легкою тваринами не має перевищувати 100 г. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок по групах. Мурчаків розподіляють по не менше як 6 рівним групам; використовують групи, що містять достатню кількість тварин для отримання результатів, що задовольняють вимогам по вірогідному аналізу, що наведені нижче. Якщо для випробовуваного провокаційного токсину не підтверджена стабільність або він стандартизований недостатньо, у випробування включають ще 5 мурчаків, як не вакцинований контроль.

### ВИБІР ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Вибирають препарат дифтерійного токсину, що містить від 67 до 133 Іг/100 в 1 Lf і від 25 000 до 50 000 мінімально реактивних доз для шкіри мурчаків в 1 Lf. Якщо для препарату провокаційного токсину продемонстрована стабільність, перевірка активності при кожному визначенні не потрібна.

### ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Безпосередньо перед застосуванням провокаційний токсин розводять підходящим розчинником для отримання розчину токсину, що містить близько 0.0512 Lf в 0.2 мл. З отриманого розчину готують серію з п'яти чотирикратних розведень, що містить близько 0.0128, 0.0032, 0.0008, 0.0002 та 0.00005 Lf в 0.2 мл.

### РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ

Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату, таким чином, щоб для кожного отримати серії розведень, відмінні кроком не більше за 2.5 рази, і в яких проміжне розведення при ін'єкції підшкірної дози становило 1.0 мл на мурчача, і давало внутрішньошкірну реакцію близько 3 при провокаційному тесті у тварин.

### ІМУНІЗАЦІЯ ТА ПРОВОКАЦІЯ

Розведення розподіляють по 1 на кожну групу мурчаків та підшкірно вводять по 1.0 мл кожній тварині в групі. Через 28 діб проводять депіляцію обох боків тіла кожного мурчача та підшкірно кожному з них вводять по 0.2 мл 6 розведень токсину в 6 окремих ділянок, так щоб вони мінімально впливали одне на одне.

### ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Якщо необхідно, невакцинованим контрольним тваринам вводять розведення, що містить 80, 40, 20, 10 та  $5 \times 10^{-6}$  Lf провокаційного токсину зараження.

### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Всі ділянки шкіри з ін'єкціями провокаційного токсину обстежують через 48 год після ін'єкції та фіксують випадки специфічної дифтерійної еритеми. Записують кількість ділянок внутрішньошкірної провокації вільних від таких реакцій. Складають таблицю результатів внутрішньошкірної провокації для всіх тварин, що отримали те саме розведення вакцини та використовують ці дані з придатною трансформацією, такою як  $(\text{число})^2$  або  $\arcsin(\text{число}/6)^2$  для отримання оцінки відносної активності для кожного випробовуваного препарату з використанням моделі паралельних ліній.

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

### ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ

Випробування вважається вірогідним, якщо:

- для випробовуваної вакцини та стандартного препарату середнє число, отримане на рівні найменшої дози менше трьох та середнє число на рівні найвищої дози більше трьох;
- де застосоване, розведення токсину, що містить  $40 \times 10^{-6}$  Lf викликає позитивну епідемію не менше ніж у 80 % контрольних мурчаків та розведення, що містить  $20 \times 10^{-6}$  Lf викликає позитивну епідемію не менш як у 80 % мурчаків (якщо не виконуються ці критерії необхідно вибрати інший токсин);
- довірчі інтервали ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % і не більше 200 % від установленої активності;
- статистичний аналіз не виявляє відхилень від лінійності та паралельності.

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

### МЕТОД В: ЛЕТАЛЬНА ПРОВОКАЦІЯ У МУРЧАКІВ

#### ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБОВУВАНИХ ТВАРИН

У випробуванні використовують здорових мурчаків однієї лінії, масою 250-350 г кожна. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок по групах. Мурчаків розподіляють по не менш як 6 рівних групах; використовують групи, з достатньою кількістю тварин для отримання результатів, що задовольняють вимогам вірогідного аналізу, наведених нижче. Якщо випробуваний провокаційний токсин не стабільний або він недостатньо стандартизований, у випробування включають ще 4 групи з 5 мурчаків в кожній як невакцинований контроль.

#### ВИБІР ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Вибирають препарат дифтерійного токсину, що має не менше 100 LD<sub>50</sub> на мілілітр. Якщо препарат провокаційного токсину стабільний, перевірка активності при кожному визначенні не потрібна.

#### ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Безпосередньо перед застосуванням провокаційний токсин розводять підходящим розчинником для отримання розчину токсину, що містить близько 100 LD<sub>50</sub>/мл. Якщо необхідно, використовують порції розчину токсину, розведені в тому ж розчиннику 1:32, 1:100 та 1:320.

### РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ

Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р, готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату, таким чином, щоб для кожного отримати серії розведень, відмінні кроком не більше за 2.5 рази, і в яких проміжні розведення при підшкірній ін'єкції по 1.0 мл на мурчака, захищали б приблизно 50 % тварин від летальних ефектів дифтерійного токсину, встановлених для даного випробування.

### ІМУНІЗАЦІЯ ТА ПРОВОКАЦІЯ

Розведення розподіляють по 1 на кожен групу мурчаків та вводять підшкірно по 1.0 мл кожній тварині в групі. Через 28 діб кожному мурчаку підшкірно вводять по 1.0 мл розчину провокаційного токсину (100 LD<sub>50</sub>).

### ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Якщо необхідно, розподіляють розчин провокаційного токсину та його 3 розведення по одному в 4 групах, що складаються з 5 мурчаків кожна, і вводять підшкірно кожній тварині по 1.0 мл відповідного розчину.

### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Враховують кількість мурчаків, що вижили через 4 доби після ін'єкції токсину. Розраховують активність випробовуваної вакцини відносно активності стандартного препарату на основі співвідношення тварин, що вижили в кожній з вакцинованих груп тварин, використовуючи звичайний метод статистичного аналізу (наприклад, 5.3).

### ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ

Випробування вважається вірогідним, якщо:

- для випробовуваної вакцини та стандартного препарату 50 % захисної дози знаходиться між максимальною та мінімальними дозами препаратів, введених мурчакам;
- де застосоване, кількість тварин, що гинуть в 4 групах (по 5 мурчаків у кожній) яким введено провокаційний токсин та його три розведення, вказує на те, що провокаційна доза становить 100 LD<sub>50</sub>;
- довірчі інтервали ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % та не більше 200 % від установленої активності;
- статистичний аналіз не виявляє відхилень від лінійності та паралельності.

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

**МЕТОД С: ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ У МУРЧАКІВ****ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБОВУВАНИХ ТВАРИН**

У випробуванні використовують здорових мурчаків однієї лінії, масою 250-350 г кожна. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок за групами. Мурчаків розподіляють по не менше як 6 рівних групах; використовують групи, з достатньою кількістю тварин для отримання результатів, що задовольняють вимогам вірогідного аналізу, наведених нижче. Якщо випробуваний провокаційний токсин не стабільний або він недостатньо стандартизований, у випробування включають ще 4 групи з 5 мурчаків в кожній як не вакцинований контроль.

**СТАНДАРТНИЙ ПРЕПАРАТ**

Використовують відповідний стандартний препарат такий, наприклад, як *БСП вакцини для профілактики дифтерії (адсорбована)* або партію вакцини, для якої підтверджена ефективність в клінічних випробуваннях, або репрезентативну партію, для якої активність розраховано в МО відносно *БСП вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої)* або міжнародного стандарту для дифтерійного анатоксину (адсорбованого).

**РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ**

Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р, готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату; виявлено, що відповідними є серії розведень, відмінні кроком від 2.5 до 5 разів. Використовують не менше 3 розведень в межах, наприклад, 0.5-16 МО/мл для стандартного препарату вакцини та в межах, наприклад, 1:2 та 1:125 для випробовуваної вакцини. Розведення використовують протягом 1 год після приготування. Розподіляють по 1 розведенню на кожну групу мурчаків.

**ІМУНІЗАЦІЯ**

Вводять кожній із дослідних тварин по 1.0 мл підшкірно розведення, що відповідає даній групі.

**ЗАБІР КРОВІ**

Через 35-42 доби після імунізації у кожної вакцинованої та контрольної тварини відповідним методом відбирають пробу крові.

**ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ СИРОВАТКИ**

Уникають частих заморожувань та розморожувань зразків сироватки. Для уникнення мікробної кон-

тамінації надати перевагу проведення всіх маніпуляцій в ламінарному боксі.

**ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ АНТИТІЛ**

Розраховують відносний титр антитіл або число кожного зразка сироватки підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Підходящим вважаються методи, приведені нижче (імуноферментний аналіз (ELISA) та аналіз на клітинах Vero).

**РОЗРАХУНОК АКТИВНОСТІ**

Розраховують активність випробовуваної вакцини в МО відносно стандартного препарату, використовуючи статистичні методи (наприклад 5.3).

**ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ**

Випробування вважається вірогідним, якщо:  
— довірчі інтервали ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % та не більше 200 % від розрахованої активності;  
— статистичний аналіз не виявляє відхилень від лінійності та паралельності (стаття 5.3 описує можливі альтернативи при виявленні значних відхилень).

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

*Нижче наведений розділ має інформаційний характер*

**КЕРІВНИЦТВО:  
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ  
ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ  
(АДСОРБОВАНОЇ)****МЕТОД С. ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ У МУРЧАКІВ****ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ СИРОВАТКИ**

Відповідним методом приготування зразків сироватки вважається метод наведений нижче. Пробірки, що містять зразки крові 6 разів перевертають та інкубують при температурі 37 °С протягом 2 год, потім при температурі 4 °С протягом 2 год. Центрифугують при кімнатній температурі на швидкості 800 г протягом 20 хв. Сироватки переносять в стерильні пробірки та зберігають при температурі нижче -20 °С. При використанні даного методу вихід сироватки складає не менше 40 %.

**ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ АНТИТІЛ**

Нижче наведені приклади підходящих імунохімічних методів визначення титру антитіл — метод ELISA та аналіз на клітинах Vero.



## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

Визначення титру антитіл в сироватці мурчаків твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA). У планшетах для ELISA покритих дифтерійним анатоксином готують розведення випробовуваної та стандартної сироваток. У кожному планшеті передбачають позитивні та негативні контрольні сироватки мурчаків для моніторингу відтворюваності випробування. До кон'югованих пероксидазою антитіл кроля або кози проти IgG мурчаків, додають субстрат для пероксидази. Вимірюють оптичну густина та розраховують титр антитіл, використовуючи відповідний статистичний метод (наприклад, 5.3).

### Реактиви та обладнання

- Планшети для ELISA: 96 лунок, 1-12 стовпчиків, рядів від А до Н.
- Протидифтерійна сироватка мурчаків (для вакцин для застосування людиною) (позитивна контрольна сироватка), отримана імунізацією мурчаків БСП вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованою).
- Пероксидазний кон'югат. Кон'юговані пероксидазою антитіла кроля або кози проти IgG мурчаків.
- Дифтерійний анатоксин.
- Карбонатний буфер рН 9.6 для покриття. 1.59 г натрію карбонату безводного Р та 2.93 г натрію гідроксикарбонату Р розчиняють в 1000 мл води Р. Отриманий розчин розливають у флакони місткістю 150 мл та стерилізують автоклавуванням при температурі 121 °С протягом 15 хв.
- Фосфатно-сольовий буфер рН 7.4 (PBS). 80.0 г натрію хлориду Р, 2.0 г калію гідрофосфату Р, 14.3 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 2.0 г калію хлориду Р перемішуючи розчиняють в 1000 мл води Р. Зберігають при кімнатній температурі, уникаючи кристалізації. Перед застосуванням розчин розводять 1:9 водою Р.
- Розчин кислоти лимонної. 10.51 г кислоти лимонної Р розчиняють в 1000 мл води Р та доводять рН розчину до 4.0, використовуючи розчин 400 г/л натрію гідроксиду Р.
- Промивний буфер. PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р.
- Блокуючий буфер. PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р та 25 г/л сухих вершків.
- Субстрат для пероксидази. Незадовго до використання 10 мг діамонію 2,2'-азинобіс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонату) Р (ABTS) розчиняють в 20 мл розчину кислоти лимонної. Безпосередньо перед використанням додають 5 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.

### Метод

Нижче як приклад наведено опис розкладки планшета, але можна це провести інакше. Лунки 1А-Н використовують для негативної контрольної сироватки, лунки 2А-Н та 12А-Н для позитивної контрольної сироватки для моніторингу аналізу. Лунки 3-11А-Н для випробовуваних зразків.

Кожну лунку планшета для ELISA покривають 100 мкл розчину дифтерійного анатоксину (0.5 Лf/мл в карбонатному буфері рН 9.6) для покриття. Інкують протягом ночі при температурі 4 °С у вологому середовищі. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта не складають у висоту більше 4 планшетів. На наступний день ретельно промивають планшети промивним буфером. Планшети блокують, додаючи в кожен лунку по 100 мкл блокуючого буферу. Інкують у вологому середовищі при температурі 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають промивним буфером. По 100 мкл блокуючого буферу додають в кожен лунку крім ряду А. Готують відповідне розведення негативної та позитивної контрольних сироваток (близько 0.01 МО/мл), та випробовуваної сироватки. Розподіляють негативну контрольну сироватку по стовпцю 1, позитивну контрольну сироватку по стовпцях 2 та 12, та випробовувану сироватку по стовпцях 3-11 і додають по 100 мкл кожної сироватки до перших 2 лунок відповідного стовпця. Використовуючи мультіканальну мікропипетку, роблять двократне серійне розведення від ряду В вниз до ряду Н, переносячи по 100 мкл з однієї лунки в наступну. Відбирають 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. Готують відповідне розведення (виявлено, що відповідним є 2000-кратне розведення) пероксидазного кон'югату в блокуючому буфері та додають по 100 мкл в кожен лунку. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. До кожної лунки додають по 100 мкл субстрату для пероксидази. Витримують при кімнатній температурі, в захищеному від світла місці протягом 30 хв. Планшети переглядають при довжині хвилі 405 нм в тому самому порядку в якому додавали субстрат.

Визначення титру антитіл в сироватці мурчаків кількісним визначенням на клітинах Vero. Використовуваний метод заснований на визначенні в кінці випробування інгібування метаболізму (метод 1), або цитотоксичності (метод 2), або мікроскопічного (клітинної морфології) чи візуального (кольорового) контролю клітин.

Межа чутливості специфічна для кожного антитоксину та звичайно складає від 0.015 МО/мл (метод 1) до 0.05 МО/мл (метод 2).

За кінцеву точку беруть найбільше розведення сироватки, що захищає клітини від дії дифтерійного токсину. Активність антитоксину розраховують відносно мурчаків або стандартного препарату ВООЗ, та виражають в МО на 1 мл.

### Реактиви та обладнання:

- Плоскодонні планшети для культур тканин: 96 лунок, стовпці 1-12, ряди А-Н.

- флакон для культури тканин 75 см<sup>2</sup>.
- Дифтерійний токсин
- Протидифтерійна сироватка мурчаків (для вакцин, для застосування людиною) (позитивна контрольна сироватка), отримана імунізацією мурчаків БСП вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої).
- Клітини Vero (ниркові клітини Африканських Зелених мавп). Відповідними для використання являються клітин після пасажів від P2 до P15.

**Метод 1.** Дифтерійний токсин має цитопатогенний ефект у відношенні клітин Vero, приводячи до їх лізису. Антитіла проти дифтерійного токсину можуть інгібувати цей цитопатогенний ефект. Отже активність вакцини для профілактики дифтерії можна не напряму визначити за допомогою цих клітинних культур, якщо різне розведення сироватки з імунізованих тварин культивувати з постійною концентрацією токсину. У визначенні клітин Vero жовтий колір вказує на життєздатні клітки, а червоний — на мертві. Якщо мертві частина клітин, колір може бути помаранчевим.

#### Реактиви та обладнання:

- Модифіковане МЕМ. Мінімальне незамінне середовище (МЕМ) з солями Ерла, без L-глутаміну та натрію бікарбонату.
- Модифіковане середовище 199. Середовище 199 з розчином Хенкса та L-глутаміном, без натрію бікарбонату.
- Сироватка бичача ембріональна.
- 75 % розчин натрію бікарбонату.
- Розчин трипсину: 2.5 % розчин трипсину.
- Розчин ЕДТА: 0.02 % розчин ЕДТА ((етиленадиприлін)тетраоцтова кислота 1:5000).
- Модифікований D-PBS. фосфатно-сольовий буфер Дульбека (D-PBS) без кальцію або магнію.
- 200 мМ розчин L- глутаміну.
- Розчин пеніциліну/стрептоміцину
- Первинне середовище для культивування. До 50 мл модифікованого МЕМ додають 440 мл води P, 5 мл 200 мМ розчину L-глутаміну та 10 мл 7.5 % розчину натрію бікарбонату. До 25 мл цього середовища додають 1.25 мл сироватки бичачої ембріональної.
- Основне середовище для культивування. Аналогічно первинному середовищу для культивування, але замість 1.25 мл сироватки бичачої ембріональної додають 0.5 мл до 20 мл збагаченого МЕМ середовища.
- Середовище А. До 50.0 мл модифікованого середовища 199 додають 440 мл води P, 5.0 мл 200 мМ розчину L-глутаміну та 10.0 мл 7.5 % розчину натрію бікарбонату.
- Середовище В. До 150.0 мл середовища А додають 3.0 мл сироватки бичачої ембріональної та 0.3 мл розчину пеніциліну/стрептоміцину.
- Середовище С. До 22.0 мл середовища А додають 0.44 мл сироватки бичачої ембріональної та 0.44 мл розчину пеніциліну/стрептоміцину.

Клітини Vero культивують у флаконі для тканинної культури (наприклад 75 см<sup>2</sup>/250 мл) в інкубаторі при температурі 36±1 °С, 5 % CO<sub>2</sub> та 90 % відносної вологості. З початку клітини Vero вирощують в первинному середовищі для культивування. Через 2-3 доби зростання, первинне середовище для культивування замінюють основним середовищем. Коли вже отримано виражений (конфлюентний) моношар, надосадову культуру видаляють та клітинний шар обережно промивають модифікованим D-PBS. До флакона додають 1 об'єм розчину трипсину та 1 об'єм розчину ЕДТА. Обережно перемішують флакон обертальними рухами та інкубують в середовищі CO<sub>2</sub> в інкубаторі протягом близько 3 хв, поки клітини не почнуть відділятися від моношару. Енергійно натискають на стінки флакона для падіння клітин. Ресуспезують клітини в 5-6 мл свіжого середовища С для отримання гомогенної суспензії, що містить приблизно 1 x 10<sup>5</sup> клітин/мл.

По 25 мкл середовища В розливають в кожну лунку крім стовпця 1. 25 мкл дифтерійної антисыворотки мурчаків (для вакцин для застосування людиною) (позитивна контрольна сироватка, робоче розведення в середовищі В 0.40 МО/мл) додають в лунки А1, А2 та А11. По 25 мкл зразків сироваток мурчаків вміщують в лунки В-Г стовпців 1, 2 та 11. 25 мкл негативної контрольної сироватки вміщують в ряди Н стовпця 1, 2 та 11. Використовуючи мультиканальну мікропіпетку проводять ряд двократних розведень по планшету (зі стовпця 2 вгору до 10 для рядів А-Г та до 8 стовпця для ряду Н). Видаляють 25 мкл з лунки стовпця 10 в рядях А-Г та з лунки Н8.

Дифтерійний токсин розчиняють в сольовому розчині до отримання розчину 50 МО/мл. Готують 50-кратне розведення дифтерійного токсину в середовищі В для отримання робочого розчину, що вміщує 1.0 МО/мл. 25 мкл отриманого робочого розчину додають до лунок А12 та В12 (контроль токсину). Проводять ряд двократних розведень, переносючи 25 мкл з однієї лунки в іншу — з лунки В12 вниз до Н12. Наконечник міняють після кожного розведення. 25 мкл відбирають з лунки Н12. У лунки В12-Н12 додають по 25 мкл середовища В. Потім 25 мкл робочого розчину дифтерійного токсину (розведення 1.0 МО/мл) додають в кожну лунку ряду Н, зі стовпців 1-10, крім Н9 та Н10 (тільки клітини без сироватки та токсину).

Планшети накривають кришкою або іншим відповідним засобом та обережно струшують. Планшети інкубують протягом не менше ніж 2 год у вологому контейнері в CO<sub>2</sub> інкубаторі при температурі 37 °С. Додають 200 мкл клітинної суспензії, що містить 1x10<sup>5</sup> клітин/мл до всіх лунок. Планшети накривають кришкою. Інкубують при температурі 37 °С протягом 5 діб. Мікробіологічне забруднення контролюють мікроскопічним дослідженням.

Жовтого кольору лунка враховується як негативна, а лунка червоного кольору вказує на загибель клітин та враховується як позитивна. Колір між жовтим

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

та червоним вказує на суміш мертвих та життєздатних клітин, і вони враховуються як позитивно/негативні. Результати по зміні кольору можуть підтверджуватися переглядом всіх клітин в лунках під мікроскопом.

Активність зразків антисироватки мурчаків отримують порівнюючи останню лунку стандартного препарату, в якому повинна спостерігатися повна нейтралізація токсину, з останньою лункою зразка, що виявив такий же ефект. Для розрахунку активності потрібно враховувати, що кінцева точка може бути між негативними та позитивно/негативними лунками.

Метод 2: Тіазоліловий синій МТТ перетворюється в синьо/чорно формазановий продукт мітохондріальною дегідрогеназою життєздатних клітин, і таким чином він служить кількісною міткою живих клітин, що є в наявності, показуючи коли токсин нейтралізується антитоксином. Біла або безбарвна лунка вказує на відсутність життєздатних клітин внаслідок недостатньої нейтралізації токсину антитоксином.

### Реактиви та обладнання:

- МЕМ. Мінімально незамінне середовище (МЕМ).
- Сироватка новонароджених телят.
- Розчин антибіотика (містить 10 000 одиниць пеніциліну, 10 мг стрептоміцину та 25 мкг амфотерецину В на мілілітр).
- 200 мМ розчин L-глутаміну.
- Трипсин-ЕДТА.
- Тіазоліл синій МТТ [3(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразолію бромід].
- 1 М HEPES буфер рН 8.1. 18.75 г HEPES розчиняють в 82.5 мл води Р та додають 30.0 мл 2 М розчину натрію гідроксиду Р.
- Розчин глюкози (10 %).
- Готове середовище для культивування. Змішують 200 мл МЕМ, 10 мл сироватки новонароджених телят, 3.0 мл 1 М розчину HEPES буферу рН 8.1, 2.0 мл розчину глюкози (10 %), 2.0 мл розчину антибіотику та 2.0 мл 200 мМ розчину L-глутаміну.
- Фосфатно-сольовий буфер рН 7.4 (PBS). 10.0 г натрію хлориду Р, 0.75 г калію хлориду Р, 1.44 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 0.125 г калію дигідрофосфату Р перемішуючи розчиняють у воді Р та доводять об'єм до 1000.0 мл, тим же розчинником. Якщо необхідно, доводять рН. Автоклавують при температурі 120 °С протягом 15 хв.
- Розчин тіазолілу синього МТТ. 0.1 г тіазолілу синього МТТ розчиняють в 20 мл PBS. Стерилізують фільтрацією (0.2 мкм) та зберігають в темних пляшках.
- Розчин для доведення рН. Змішують 40 мл оцтової кислоти Р, 1.25 мл 1 М хлористоводневої кислоти та 8.75 мл води Р.
- Екстракційний буфер рН 4.7. 10 г натрію лаурилсульфату Р розчиняють у воді Р та додають 50 мл диметилформаміду Р і доводять об'єм розчину во-

дою Р до 100 мл. Доводять рН розчину відповідним об'ємом розчину для доведення рН.

Клітини Vero культивують у флаконі для тканинної культури (наприклад 75 см<sup>2</sup>/250 мл) в інкубаторі при температурі (36±1) °С, 5 % CO<sup>2</sup> та 90 % відносної вологості. На початку клітини Vero вирощують в первинному середовищі для культивування. Через 6-7 діб зростання, коли отримано виражений (конфлюентний) моношар, надосадову культуру видаляють та клітинний шар промивають 3 рази трипсин-ЕДТА: обережно піпеткою нашаровують на середовище 0.5-1 мл трипсин-ЕДТА, флакон обертають та відсмоктують трипсин. Процес повторюють двічі, а в третій раз флакон кладуть в інкубатор та витримують протягом 5 хв, поки не почне руйнуватися моношар клітин. Енергійно натискають на стінки флакона для падіння клітин. Для отримання гомогенної суспензії ресуспезують клітини в 6-25 мл свіжого середовища для культивування, що містить приблизно 4 x 10<sup>5</sup> клітин/мл

По 50 мкл середовища для культивування розливають в кожну лунку крім стовпця 1. 100 мкл дифтерійної проти сироватки мурчаків (для вакцин, що застосовуються людиною) (позитивна контрольна сироватка, робоче розведення в середовищі для культивування 0.12 МЕ/мл) додають в лунку А1 та 50 мкл в лунку А11. По 100 мкл випробовуваних зразків сироваток мурчаків, якщо необхідно розведених, вміщують в лунки В1-Г1. По 50 мкл тих самих зразків додають в лунки В11-Г11, відповідного ряду. 100 мкл негативної контрольної сироватки вміщують в лунку Н1 та 50 мкл в лунку Н11. Використовуючи мультиканальну мікропіпетку проводять ряд двократних розведень, переносячи по 50 мкл з однієї лунки в іншу по планшету (зі стовпця 1-10 для рядів А-Г та з стовпця 1-8 для ряду Н).

Дифтерійний токсин з відомою активністю та вмістом Lf розводять, готуючи відповідний робочий запас, що містить не менше ніж 4 мінімальних цитопатичних доз в середовищі для культивування. По 50 мкл отриманих робочих розчинів додають в кожну лунку крім Н9 та Н10 (контрольні клітини), А11-Н11 (контроль сироватки) та А12-Н12 (контроль токсину). До лунки А12 додають 100 мкл розведеного токсину та готують двократне розведення, переносячи по 50 мкл з однієї лунки в іншу вниз по планшету (з лунки А12-Н12). Видаляють 50 мкл з лунки Н12. До лунки Н9 та Н10 додають по 50 мкл повного середовища для культивування.

Для нейтралізації токсину планшети покривають кришкою або іншим відповідним засобом та витримують при кімнатній температурі протягом 1 год. У всі лунки додають по 50 мкл клітинної суспензії, що містить 4 x 10<sup>5</sup> клітин/мл. Планшет закривають кришкою. Інкують при температурі 37 °С протягом 6 діб. Мікробіологічне забруднення контролюють мікроскопічним дослідженням. До кожної лунки додають по 10 мкл тіазолілу синього МТТ. Планшети інкують при температурі 37 °С ще про-

тягом 2-4 год. Потім видаляють середовище та до кожної лунки додають по 100 мкл екстракційного буферу рН 4.7. Для екстракції планшети інкубують протягом ночі при температурі 37 °С. По завершенні екстракції та повного розчинення, планшети досліджують візуально або передивляються при довжині хвилі 570 нм.

Синьо/чорна лунка враховується як негативна (всі клітини живі, токсин нейтралізований антитоксином), біла або безбарвна лунки вказують на наявність мертвих клітин (немає нейтралізації токсину), та враховуються як позитивні.

Активність випробовуваного антитоксину отримують порівнюючи останню лунку стандартного препарату антитоксину, що показала повну нейтралізацію токсину, з останньою лункою препарату антитоксину, що виявив такий самий ефект. Титр нейтралізуючих антитіл випробовуваного зразка може бути розрахований шляхом множення розведення загальної кількості МО на мілілітр стандартного препарату в кінцевій точці. Випробування вважається придатним, якщо всі клітини в контролі токсину мертві та стандартний антитоксин нейтралізує принаймні перші два досліджуваних розведення.

### 2.7.7. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КАШЛЮКУ (ЦІЛЬНОКЛІТИННОЇ)

Активність вакцини для профілактики кашляку визначають шляхом порівняння дози вакцини, необхідної для захисту мишей від ефектів летальної дози *Bordetella pertussis*, що вводиться інтрацеребрально, з кількістю стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО), яке необхідне для отримання такого ж захисту.

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з певної кількості висушеної вакцини для профілактики кашлюку. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

**Вибір та розподіл випробовуваних тварин.** У випробуванні використовують здорових мишей відповідної лінії з однієї партії, віком менше 5 тижнів. Різниця в масі між самою важкою та самою легкою твариною не має перевищувати 5 г. Мишей ділять на шість груп не менше ніж 16 в кожній та чотири групи по 10 тварин. Миші мають бути однієї статі, або самці та самки мають бути рівномірно розподілені за групами.

**Вибір провокаційного штаму, та приготування суспензії для провокації.** Вибирають відповідний штамм *B. pertussis*, здатний призвести до загибелі мишей протягом 14 діб після інтрацеребральної ін'єкції. Штамм вважають невідповідним якщо більше за

20 % мишей гине протягом 48 год після ін'єкції. Проводять одне пересівання штаму, суспензують зібрані клітини *B. pertussis* в розчині, що містить 10 г/л казеїна гідролізату Р та 6 г/л натрію хлориду Р (рН від 7.0 до 7.2), або в іншому підходящому розчині. Визначають ступінь каламутності суспензії. Використовуючи вказаний розчин, готують ряд розведень. Кожне з отриманих розведень закріплюють за однією групою з не менше як із 10 мишей. Кожній миші інтрацеребрально вводять дозу (0.02 мл або 0.03 мл) розведення, що відповідає даній групі. Через 14 діб підраховують кількість мишей, що вижили в кожній з груп. Виходячи з цих результатів, обчислюють очікуваний ступінь каламутності суспензії, що містить 100 LD<sub>50</sub> в кожній провокаційній дозі. Для визначення активності випробовуваної вакцини проводять нове пересівання того самого штаму *B. pertussis*, із зібраної мікробної маси готують суспензію зі ступенем каламутності, що відповідає близько 100 LD<sub>50</sub> в кожній провокаційній дозі. Готують три розведення суспензії для провокації.

**Визначення активності.** Готують три послідовні розведення випробовуваної вакцини та три аналогічні розведення стандартного препарату таким чином, щоб для кожного з проміжного розведення очікуваний ступінь захисту мишей від летальних ефектів провокаційної дози *B. pertussis* становив 50 %. Дози, що пропонуються до випробування становлять 1/8, 1/40 та 1/200 дози для людини випробовуваної вакцини та 0.5 МО, 0.1 МО та 0.02 МО стандартного препарату. Кожна з доз має міститися в об'ємі, що не перевищує 0.5 мл. За кожною з 6 груп (з не менше як 16 мишей в кожній) закріплюють одне розведення з отриманих шести. Кожній миші внутрішньоочередно вводять одну дозу розведення, що відповідає даній групі. Через 14-17 діб кожній миші в усіх групах (не менше 16) інтрацеребрально вводять одну дозу суспензії для провокації. Використовуючи вказану суспензію готують три її розведення. Суспензію для провокації та кожне з отриманих розведень закріплюють за однією групою з не менше як із 10 мишей кожна. Кожній миші інтрацеребрально вводять одну дозу суспензії, що відповідає даній групі. Мишей, які загибли протягом 48 год після провокації, в розрахунках не враховують. Через 14 діб підраховують кількість мишей, що вижили в кожній із груп. Активність випробовуваної вакцини розраховують відносно активності стандартного препарату, виходячи з кількості тварин, що вижили в кожній з 6 груп (не менше ніж з 16 мишей).

Випробування вважається вірогідним, якщо:

- як для випробовуваної вакцини, так і для стандартного препарату, 50 % захисної дози знаходяться в інтервалі між найбільшою та найменшою дозами, що були введені мишам;
- кількість загиблих тварин в 4 групах по 10 мишей, яким була введена суспензія для провокації та її розведення, вказує на те, що провокаційна доза приблизно відповідає 100 LD<sub>50</sub>;

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

— при статистичному аналізі не виявляються відхилення від лінійності та паралельності.

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

### 2.7.8. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПРАВЦЯ (АДСОРБОВАНОЇ)

Активність вакцини для профілактики правцю визначають введенням вакцини тваринам (мурчакам та мишам) після їх контрольного (провокаційного) зараження правцевим токсином (метод А або В) або визначенням титру антитіл до правцевого анатоксину в сироватці мурчаків (метод С). У всіх випадках активність вакцини розраховують відносно стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО). Для методів А та В, в країнах, де метод паралічу не є обов'язковим, може використовуватись метод  $LD_{50}$ . Для методу  $LD_{50}$  кількість тварин та методики ідентичні тим, що описані для методу паралічу, але за кінцеву точку приймають замість паралічу загибель тварин.

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з певної кількості правцевого анатоксину (адсорбованого). Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*БСП вакцини для профілактики правцю (адсорбованої) калібруваний в МО по відношенню до міжнародного стандарту.*

Підбір методу визначення вакцини для профілактики правцю (адсорбованої) залежить від призначення. Метод А або В використовують:

1. при розробці вакцин для кількісного визначення виготовлених партій для валідації виробництва;
2. якщо необхідно провести повторну валідацію, через значні зміни виробничих процесів.

Метод А або В можуть також використовуватися для рутинного кількісного визначення партій вакцин, але з метою збереження тварин, по можливості слід застосовуватися метод С.

Метод С може застосовуватися, крім випадків зазначених вище в пунктах 1 та 2, після перевірки придатності методу для продукту. Для цих цілей відповідну кількість партій (звичайно 3) аналізують методом С та методами А або В. В тих випадках, коли різні вакцини (моновалентні або комбіновані) готують з дифтерійного анатоксину одного походження та з порівнянним рівнем (що відображено в  $Lf/ml$ ) того самого дифтерійного анатоксину, придатність, показана для комбінації з найбільшою кількістю

компонентів може вважатися дійсною для комбінації з меншою кількістю компонентів та для моновалентних вакцин. Будь-які комбінації, що містять такий компонент як цільноклітинний кашлюк або вакцину для профілактики інфекцій викликаних *Hemophilus influenzae* типу b (кон'югована) з правцевим анатоксином в одному флаконі, мають оцінюватися окремо.

Для комбінацій, що містять дифтерійний та правцевий компоненти, серологічний аналіз (метод С) може проводитись на тій же групі тварин, досліджених при серологічному аналізі вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8), якщо підтверджено, що звичайні умови імунізації для компонентів дифтерії та правця (наприклад, дози, тривалість) вірогідні для комбінованих вакцин.

При розробці кількісних визначень, наведених нижче, використовують численні розведення випробовуваного та стандартного препарату. Коли аналітик має достатній досвід роботи з методом для даної вакцини, можливе застосування спрощеної моделі, такої як одне розведення випробовуваного та стандартного препарату. Така модель дозволяє аналітику встановити, чи є активність випробовуваного препарату значно вище мінімально необхідної, але не дає інформації з лінійності, паралельності та криву доза-відповіді. Спрощена модель дозволяє значно зменшити кількість необхідних тварин, що відповідає положенню Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

Якщо при кількісному визначенні використовують одне розведення, час від часу слід перевіряти відтворюваність виробництва та випробування відповідними індикаторами і періодично, наприклад, кожні 2 роки, проводити повний аналіз із численними розведеннями. Для серологічного аналізу відповідними індикаторами для контролю відтворюваності випробування є:

- середнє та стандартне відхилення відносних титрів анатоксину або число зразків сироватки, отриманих після застосування фіксованих доз стандартного препарату вакцини;
- титр антитоксину або число контрольних прогонів (позитивні та негативні зразки сироватки);
- співвідношення титрів антитоксину або числа позитивних контрольних сироваток на зразки сироваток, відповідних стандартній вакцині.

### МЕТОД А: ПРОВОКАЦІЙНИЙ ТЕСТ НА МУРЧАКАХ

#### ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБУВАНИХ ТВАРИН

У випробуванні використовують здорових мурчаків однієї лінії, кожний масою 250–350 г. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок за групами. Мурчаків розподі-

ляють не менше як на 6 рівних груп; використовують групи, що містять достатню кількість тварин для отримання результатів, що задовольняють вимогам по вірогідному аналізу, що наведені нижче. Якщо для провокаційного токсину активність не встановлена включають ще 3 групи з 5 мурчаків, як не вакцинований контроль.

### ВИБІР ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Вибирають препарат правцевого токсину, що містить не менше 50-кратної 50 % паралітичної дози в мілілітрі. Якщо для препарату провокаційного токсину продемонстрована стабільність, перевірка паралітичної дози при кожному визначенні не потрібна.

### ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Безпосередньо перед застосуванням провокаційний токсин розводять відповідним розчинником (наприклад, буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7.4) для отримання стабільного розчину токсину, що містить близько 50-кратної 50 % паралітичної дози в мілілітрі. Якщо необхідно для визначення активності токсину використовують порції провокаційного токсину розведені в тому самому розчиннику 1:16, 1:50 та 1:160).

### РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ

Використовуючи розчин 9 г/л *натрію хлориду* *P* готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату, таким чином, щоб для кожного отримати серії розведень, відмінні кроком не більше за 2.5 рази, і в яких проміжні розведення при підшкірній ін'єкції становлять по 1.0 мл на мурчача, захищали б близько 50 % тварин від паралітичних ефектів після підшкірного введення кількості правцевого токсину, передбаченого для цього випробування.

### ІМУНІЗАЦІЯ ТА ПРОВОКАЦІЯ

Розведення розподіляються по 1 на кожен групу мурчаків та вводять підшкірно по 1.0 мл кожній тварині в групі. Через 28 діб кожному з них підшкірно вводять по 1.0 мл розчину провокаційного токсину (що містить 50 -кратну 50 % паралітичну дозу).

### ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Якщо необхідно, розподіляють 3 розведення провокаційного токсину по одному в 3 групах, що складаються з 5 мурчаків кожна, і вводять підшкірно кожній тварині по 1.0 мл відповідного розчину. Якщо

активність та стабільність для провокаційного токсину визначені при виконанні необхідної кількості визначень із 50 % паралітичною дозою, тоді в перевірці при кожному визначенні не має потреби.

### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Обстежують мурчаків кожної доби двічі на день. Вилучають та піддають евтаназії всіх тварин у яких спостерігались ознаки правцевого паралічу. Враховують кількість мурчаків протягом 5 діб без ознак паралічу після введення провокаційного токсину. Розраховують активність випробовуваної вакцини відносно активності стандартного препарату на основі співвідношення тварин з провокацією без ознак паралічу в кожній з груп вакцинованих мурчаків, використовуючи звичайний метод статистичного аналізу (наприклад, 5.3).

### ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ

- Випробування вважається вірогідним, якщо:
- для випробовуваної вакцини та стандартного препарату 50 % захисна доза знаходиться в інтервалі між найбільшою та найменшою дозами, що були введені мурчачам;
  - де застосовне, що у випадку проведення відповідного випробування кількість паралізованих тварин в 3-х групах, по 5 мурчаків, яким ін'єкційно був введений розчин провокаційного токсину та його розведення, вказує на те, що провокація відбулася близько 50 -кратної 50 % паралітичної дози;
  - довірчі інтервали ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % і не більше 200 % від установленної активності;
  - статистичний аналіз не виявляє значних відхилень від лінійності, паралельності та кривої доза-відповідь (стаття 5.3 описує можливі альтернативи при виявленні значних відхилень).

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

### МЕТОД В: ПРОВОКАЦІЙНИЙ ТЕСТ НА МИШАХ

### ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБОВУВАНИХ ТВАРИН

У випробуванні використовують здорових мишей однієї лінії, віком близько 5 тижнів та підхожого кольору. Використовують мишей однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок за групами. Мишей розподіляють по не менш як 6 рівних групах; використовують групи, з достатньою кількістю тварин для отримання результатів, що задовольня-

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

ють вимогам вірогідного аналізу, наведених нижче. Якщо випробовуваний провокаційний токсин не стабільний або він недостатньо стандартизований, у випробування включають ще 3 групи з 5 мишей в кожній як невакцинований контроль.

### ВИБІР ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Вибирають препарат правцевого токсину, що містить не менше 100 -кратної 50 % паралітичної дози в мілілітрі. Якщо препарат провокаційного токсину стабільний, перевірка активності паралітичної дози при кожному визначенні не потрібна.

### ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Безпосередньо перед застосуванням провокаційний токсин розводять відповідним розчинником (наприклад, буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7.4) для отримання стабільного розчину токсину, що містить близько 50 -кратної 50 % паралітичної дози в 0.5 мл. Якщо необхідно для визначення активності токсину використовують порції провокаційного токсину розведені в тому самому розчиннику 1:16, 1:50 та 1:160).

### РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ

Використовуючи розчин 9 г/л *натрію хлориду Р*, готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату, таким чином, щоб для кожного отримати серії розведень, відмінні кроком не більше за 2.5 рази, і в яких проміжні розведення при підшкірній ін'єкції становлять по 0.5 мл на мишу, захищали б близько 50 % тварин від летальних ефектів правцевого токсину, передбаченого для даного випробування.

### ІМУНІЗАЦІЯ ТА ПРОВОКАЦІЯ

Розведення розподіляють по 1 на кожну групу мишей та вводять підшкірно по 0.5 мл кожній тварині в групі. Через 28 діб кожній тварині вводять підшкірно по 0.5 мл розчину провокаційного токсину, що містить 50-кратну 50 % паралітичну дозу.

### ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОВОКАЦІЙНОГО ТОКСИНУ

Якщо необхідно, розподіляють 3 розведення провокаційного токсину по одному в 3 групах, що складаються з 5 мишей кожна, і вводять підшкірно кожній тварині по 0.5 мл відповідного розчину.

### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Обстежують мишей кожної доби двічі на день. Вилучають та піддають евтаназії всіх тварин у яких

спостерігались ознаки правцевого паралічу. Враховують кількість мишей без паралічу через 4 доби після ін'єкції провокаційного токсину. Розраховують активність випробовуваної вакцини відносно активності стандартного препарату на основі співвідношення тварин з провокацією, без ознак паралічу в кожній з груп вакцинованих мишей, використовуючи звичайний метод статистичного аналізу (наприклад, 5.3).

### ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ

Випробування вважається вірогідним, якщо:

- для випробовуваної вакцини та стандартного препарату 50 % захисна доза знаходиться в інтервалі між найбільшою та найменшою дозами, що були введені мишам;
- де застосовне, що у випадку проведення відповідного випробування кількість паралізованих тварин в 3-х групах, кількістю не менше ніж 5 ін'єкційних розчинів провокаційного токсину, вказує на те, що провокаційна доза була близько 50 -кратної 50 % паралітичної дози;
- довірчого інтервалу ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % та не більше 200 % від установленної активності;
- статистичний аналіз не виявляє значних відхилень від лінійності, паралельності та кривої доза-відповідь (стаття 5.3 описує можливі альтернативи при виявленні значних відхилень).

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

### МЕТОД С: ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛУ МУРЧАКІВ

#### ВИБІР ТА РОЗПОДІЛ ВИПРОБОВУВАНИХ ТВАРИН

У випробуванні використовують здорових мурчаків однієї лінії, масою 250-350 г кожна. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок за групами. Мурчаків розподіляють по не менше як 6 рівних групах; використовують групи, з достатньою кількістю тварин для отримання результатів, що задовольняють вимогам вірогідного аналізу, наведених нижче. Якщо випробуваний провокаційний токсин не стабільний або він недостатньо стандартизований, у випробування включають ще 4 групи з 5 мурчаків в кожній як не вакцинований контроль.

#### СТАНДАРТНИЙ ПРЕПАРАТ

Використовують відповідний стандартний препарат такої, наприклад, як *БСП вакцини для профілактики правця (адсорбована)* або партію вакцини.

для якої підтверджена ефективність в клінічних випробуваннях, або репрезентативну партію, для якої активність розраховано в МО відносно БСП вакцини для профілактики правця (адсорбованої) або міжнародного стандарту для правцевого анатоксину (адсорбованого).

### РОЗВЕДЕННЯ ВИПРОБОВУВАНОВОГО ТА СТАНДАРТНОГО ПРЕПАРАТІВ

Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р, готують розведення випробовуваної вакцини та стандартного препарату; виявлено, що відповідними є серії розведень, відмінні кроком від 2.5 до 5 разів. Використовують не менше 3 розведень в межах, наприклад, 0.5-16 МО/мл для стандартно препарату вакцини та в межах, наприклад, 1:2 та 1:125 для випробовуваної вакцини. Розведення використовують протягом 1 год після приготування. Розподіляють по 1 розведенню на кожну групу мурчаків.

### ІМУНІЗАЦІЯ

Кожному із дослідних мурчаків вводять підшкірно по 1.0 мл розведення, що відповідає даній групі.

### ЗАБІР КРОВІ

Через 35-42 доби після імунізації у кожної вакцинованої та контрольної тварини відповідним методом відбирають пробу крові.

### ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ СИРОВАТКИ

Уникають частих заморожувань та розморожувань зразків сироватки. Для уникнення мікробної контамінації надати перевагу проведення всіх маніпуляцій в ламінарному боксі.

### ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ АНТИТІЛ

Розраховують відносний титр антитіл або число кожного зразка сироватки підходим імунохімічним методом (2.7.1). Підходим вважаються методи, наведені нижче (імуноферментний аналіз (ELISA) та інгібування зв'язування токсину або анатоксину (ToVi).

### РОЗРАХУНОК АКТИВНОСТІ

Розраховують активність випробовуваної вакцини в МО відносно стандартного препарату, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад 5.3).

### ВИМОГИ ДО ПРИДАТНОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ

Випробування вважається вірогідним, якщо:  
— довірчі інтервали ( $P = 0.95$ ) складають не менше 50 % та не більше 200 % від установленної активності;

— статистичний аналіз не виявляє відхилень від лінійності, паралельності та кривої доза-відповідь (стаття 5.3 описує можливі альтернативи при виявленні значних відхилень).

Випробування можна повторити, але при проведенні більше за 1 випробування результати всіх випробувань при розрахунку активності мають бути враховані.

Нижче наведений розділ має інформаційний характер

## Керівництво: Кількісне визначення вакцини для профілактики правця (адсорбованої)

### МЕТОД А: ПРОВОКАЦІЙНИЙ ТЕСТ НА МУРЧАКАХ

#### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Щоб звести до мінімуму страждання експериментальних тварин, рекомендується звертати увагу на ступінь паралічу, користуючись шкалою, що наведена нижче. Оцінка типових ознак проводиться після підшкірного введення провокаційного токсину, в середину очеревини безпосередньо позаду грудини, при цьому голка повинна бути спрямована у бік ший мурчака. Стадію Т3 приймають як кінцеву точку, але якщо експериментально отримані данні, що відповідають стадії Т2, то за кінцеву точку можна прийняти її. Правцевий токсин призводить, по крайній мірі до паралічу 1 з передніх кінцівок, що може бути виявлене в ранній стадії. Стадії правця у мурчаків характеризуються наступними ознаками:

- Т1: невелика нерухомість 1 передньої кінцівки, але спостереження утруднене;
- Т2: парез 1 передньої кінцівки, що все ще може функціонувати;
- Т3: параліч 1 передньої кінцівки, тварини рухаються з небажанням, тіло, часто внаслідок сколіозу, слегка нагадує форму банану;
- Т4: передні кінцівки цілком напружені, пальці нерухомі, спостерігається мускульна контрактура передніх кінцівок, і зазвичай спостерігається сколіоз.
- Т5: напади правця, безперервні тонічні судоми мускулатури;
- D: смерть.

### МЕТОД В: ПРОВОКАЦІЙНИЙ ТЕСТ НАМИШАХ

#### ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Щоб звести до мінімуму страждання експериментальних тварин, рекомендується звертати увагу на ступінь паралічу, користуючись шкалою, що на-



## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

ведена нижче. Оцінка типових ознак проводиться після введення провокаційного токсину в область спини близько до однієї із задніх кінцівок. Стадію Т3 приймають як кінцеву точку, але якщо експериментально отримані данні, що відповідають стадії Т2, то за кінцеву точку можна прийняти її. Правцевий токсин у кінцівці з ін'єкційно введеним токсинном призводить до парезу, що супроводжується паралічем. Стадії правця у мишей характеризуються наступними ознаками:

- Т1: невелика нерухомість в задній кінцівці з введеним токсинном, спостерігається лише коли миша піднята за хвіст;
- Т2: парез в задній кінцівці з введеним токсинном, що ще може нормально функціонувати при ходьбі;
- Т3: параліч в задній кінцівці з введеним токсинном, що не функціонує при ходьбі;
- Т4: задня кінцівка з введеним токсинном повністю напружена, пальці нерухомі.
- Т5: напади правця, безперервні тонічні судоми мускулатури;
- D: смерть.

### МЕТОД С. ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ У МУРЧАКІВ

#### ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ СИРОВАТКИ

Відповідним методом приготування зразків сироватки вважається метод наведений нижче. Пробірки, що містять зразки крові 6 разів перевертають та інкубують при температурі 37 °С протягом 2 год, потім при температурі 4 °С протягом 2 год. Центрифугують при кімнатній температурі на швидкості 800 г протягом 20 хв. Сироватки переносять в стерильні пробірки та зберігають при температурі нижче -20 °С. При використанні даного методу вихід сироватки складає не менше 40 %.

#### ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ АНТИТІЛ

Нижче наведені приклади підхожих імунохімічних методів визначення титру антитіл — метод ELISA та ToVi.

**Визначення титру антитіл в сироватці мурчаків твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA).** У планшетах для ELISA покритих дифтерійним анатоксином готують розведення випробовуваної та стандартної сироваток. У кожному планшеті передбачають позитивні та негативні контрольні сироватки мурчаків для моніторингу відтворюваності випробування. До кон'югованих пероксидазою антитіл кроля або кози проти IgG мурчаків, додають субстрат для пероксидази. Вимірюють оптичну густина та розраховують титр антитіл, використовуючи відповідні статистичні методи (наприклад, 5.3).

*Реактиви та обладнання:*

- *Планшети для ELISA:* 96 лунок, 1-12 стовпчиків, рядів від А до Н.

- *БСII сироватки проти Clostridium tetani (для застосування людиною)* (позитивна контрольна сироватка).
- *Пероксидазний кон'югат.* Кон'юговані пероксидазою антитіла кроля або кози проти IgG мурчаків.
- *Правцевий анатоксин.*
- *Карбонатний буфер рН 9.6 для покриття.* 1.59 г натрію карбонату безводного Р та 2.93 г натрію гідроксикарбонату Р розчиняють в 1000 мл води Р. Отриманий розчин розливають у флакони місткістю 150 мл та стерилізують автоклавуванням при температурі 121 °С протягом 15 хв.
- *Фосфатно-сольовий буфер рН 7.4 (PBS).* 80.0 г натрію хлориду Р, 2.0 г калію гідрофосфату Р, 14.3 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 2.0 г калію хлориду Р перемішуючи розчиняють в 1000 мл води Р. Зберігають при кімнатній температурі, уникаючи кристалізації. Перед застосуванням розчин розводять 1:9 водою Р.
- *Розчин кислоти лимонної.* 10.51 г кислоти лимонної Р розчиняють в 1000 мл води Р та доводять рН розчину до 4.0, використовуючи розчин 400 г/л натрію гідроксиду Р.
- *Промивний буфер.* PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р.
- *Блокуючий буфер.* PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р та 25 г/л сухих вершків.
- *Субстрат для пероксидази.* Незадовго до використання 10 мг діамонію 2,2'-азинобіс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонату) Р (ABTS) розчиняють в 20 мл розчину кислоти лимонної. Безпосередньо перед використанням додають 5 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.

#### Метод

Нижче як приклад наведено опис розкладки планшета, але можна це провести інакше. Лунки 1А-Н використовують для негативної контрольної сироватки, лунки 2А-Н та 12А-Н для позитивної контрольної сироватки для моніторингу аналізу. Лунки 3-11А-Н для випробовуваних зразків.

Кожну лунку планшета для ELISA покривають 100 мкл розчину дифтерійного анатоксину (0.5 Lf/мл в карбонатному буфері рН 9.6) для покриття. Інкубують протягом ночі при температурі 4 °С у вологому середовищі. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта не складають у висоту більше 4 планшетів. На наступний день ретельно промивають планшети промивним буфером. Планшети блокують, додаючи в кожен лунку по 100 мкл блокуючого буферу. Інкубують у вологому середовищі при температурі 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають промивним буфером. По 100 мкл блокуючого буферу додають в кожен лунку крім ряду А. Готують відповідне розведення негативної та позитивної контрольних сироваток (близько 0.01 МО/мл), та випробовуваної сироватки. Розподіляють негативну контрольну сироватку по стовпцю І, позитивну контрольну сироватку по

стовпцях 2 та 12, та випробовувану сироватку по стовпцях 3-11 і додають по 100 мкл кожної сироватки до перших 2 лунок відповідного стовпця. Використовуючи мультиканальну мікропіпетку, роблять двократне серійне розведення від ряду В вниз до ряду Н, переносячи по 100 мкл з однієї лунки в наступну. Відбирають 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. Готують відповідне розведення (виявлено, що відповідним є 2000-кратне розведення) пероксидазного кон'югату в блокуючому буфері та додають по 100 мкл в кожен лунку. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. До кожної лунки додають по 100 мкл субстрату для пероксидази. Витримують при кімнатній температурі, в захищеному від світла місці протягом 30 хв. Планшети переглядають при довжині хвилі 405 нм в тому самому порядку в якому додавали субстрат.

**Визначення титру антитіл в сироватці мурчаків інгібуванням зв'язування токсину або анатоксину (ToVi).** Токсин правця або анатоксин додають до серії послідовних розведень стандартної та випробовуваної сироватки: суміші сироватка/антиген інкують протягом ночі. Для визначення не зв'язаного токсину або анатоксину, суміші переносять на планшети для ELISA, покритий протиправцевою сироваткою. До кон'югованого пероксидазою кінського протиправцевого IgG додають субстрат для пероксидази. Вимірюють оптичну густину та розраховують титр антитіл, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3). Для контролю відтворюваності випробування в кожен планшет включають позитивні та негативні контрольні сироватки.

*Реактиви та обладнання:*

- *Круглодонні тверді планшети для мікротитрування з полістеролу.*
- *Плоскодонні планшети для ELISA.*
- *Токсин правця або правцевий анатоксин.*
- *БСП сироватки мурчака проти Clostridium tetani (для вакцин для застосування людиною)(позитивна контрольна сироватка).*
- *Кінський протиправцевий IgG.*
- *Кон'югований пероксидазою кінський протиправцевий IgG.*
- *Карбонатний буфер рН 9.6. 1.5 г натрію карбонату безводного Р, 2.39 г натрію гідрокарбонату Р та 0.2 г натрію азиду Р розчиняють в 1000 мл води Р. Доводять рН до 9.6 та автоклавують при температурі 121 °С*
- *Ацетатно-натрієвий буфер рН 5.5. 90.2 г натрію ацетату безводного Р розчиняють в 900 мл води Р, доводять значення рН до 5.5, використовуючи насичений розчин кислоти лимонної моногідрат Р, доводять об'єм водою Р до 1000 мл.*
- *Фосфатно-сольовий буфер рН 7.2 (PBS). 135.0 г натрію хлориду Р, 20.55 г динатрію гідрофосфата*

*дигідрату та 4.80 г натрію дигідрофосфат моногідрат Р розчиняють у воді Р та доводять до 15 л тим же розчинником. Автоклавують при температурі 100 °С протягом 60 хв.*

- *Буфер для розведення. PBS, що містить 5 г/л альбуміну бичачого Р та 0.5 г/л полісорбату 80 Р.*
- *Блокуючий буфер. PBS, що містить 5 г/л альбуміну бичачого Р.*
- *Розчин тетраметилбензидину. 6 г/л тетраметилбензидину Р розчиняють в 96 % спирті Р. Речовина розкладається протягом 30-40 хв при кімнатній температурі.*
- *Субстрат для пероксидази. Змішують 90 мл води Р, 10 мл ацетатно-натрієвого буферу рН 5.5, 1.67 мл розчину тетраметилбензидину та 20 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.*
- *Промивний розчин. Водопровідна вода, що містить 0.5 г/л полісорбату 80 Р.*

### Метод

Планшети для мікротитрування блокують, поміщаючи в кожен лунку по 150 мкл блокуючого буферу. Накривають планшети кришкою або іншим відповідним засобом. Інкують у вологому середовищі при температурі 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають, використовуючи промивний розчин. Поміщають 100 мкл PBS в кожен лунку. Поміщають 100 мкл стандартної протиправцевої сироватки мурчаків в першу по рахунку лунку в ряду. Поміщають 100 мкл не розбавленої випробовуваної сироватки в першу по рахунку лунку наступного ряду/ів (необхідну кількість разів). Використовуючи мультиканальну мікропіпетку, роблять двократне серійне розведення уперек планшета (до колонки 10), переносячи по 100 мкл з однієї лунки в наступну. Видаляють 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Готують 0.1 Лf/мл розчин токсину правця або анатоксину, використовуючи PBS як розчинник. Додають 40 мкл цього розчину в кожен лунку окрім лунок колонки 12. Лунки колонки 11 – це позитивний контроль. Додають 40 мкл PBS в лунки колонки 12 (негативний контроль). Планшети обережно струшують та накривають їх кришками. Покриття планшетів для ELISA: безпосередньо перед використанням роблять відповідне розчинення кінського протиправцевого IgG в карбонатному буфері рН 9.6 та додають 100 мкл в кожен лунку. Інкують 2 паралелі планшетів протягом ночі у вологому середовищі при температурі 37 °С. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта не складають у висоту більше 4 планшетів. Накривають планшети кришками. Наступного дня ретельно промивають планшети для ELISA промивним розчином. Блокують планшети, поміщаючи в кожен лунку 125 мкл блокуючого буфера. Інкують у вологому середовищі при температурі 37 °С протягом 1 год. Ретельно промивають планшети для ELISA промивним розчином. Переносять 100 мкл суміші після інкубації з планшета для мікротитрування у відповідні лунки планшета

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

для ELISA, починаючи з колонки 12 і потім продовжуючи від 1 до 11. Накривають планшети кришкою. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 2 год. Ретельно промивають планшети для ELISA, використовуючи промивний розчин. Роблять відповідні розведення (раніше було виявлено, що відповідним є 4000-кратне розведення) кон'югованого пероксидазою кінського протиправцевого IgG в буфері для розведення. У кожен лунку додають 100 мкл розчину та накривають планшети кришкою. Інкують при температурі 37 °С у вологому середовищі протягом 1.5 год. Ретельно промивають планшети для ELISA, використовуючи промивний розчин. у кожен лунку додають 100 мкл субстрата для пероксидази; з'являється сине забарвлення. Інкують планшети при кімнатній температурі. Зупиняють реакцію у встановлений термін (в межах 10 хв) додаванням 100 мкл 2 М розчину кислоти сірчаної Р в кожен лунку з вже доданим субстратом; забарвлення повинне змінитися від синього в жовтий. негайно після додавання кислоти сірчаної Р вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 450 нм або тримають планшети в темному місці до вимірювання.

### 2.7.14. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЕПАТИТУ А

Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту А проводять або *in vivo* шляхом порівняння здатності вакцини та стандартного препарату в певних умовах індукувати утворення специфічних антитіл у мишей, або *in vitro* імунохімічним визначенням вмісту антигена.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ *IN VIVO*

Нижче як приклад наведений метод випробування на мишах, що вважається придатним для даної вакцини; можуть також використовуватися інші валідовані методи.

**Вибір і розподіл випробовуваних тварин.** У випробуванні використовують здорових мишей, придатних для випробування ліній і одного приплоду, близько п'ятижневого віку. Використовують тварин однієї статі. Тварин нарівно розподіляють у 7 груп, кількість тварин в яких відповідає вимогам випробування.

**Визначення активності випробовуваної вакцини.** Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р, до складу якого входить ад'ювант, що містить алюміній, використаний у вакцині, готують не менше 3 розведення випробовуваної вакцини і відповідні розведення стандартного препарату. За кожною групою тварин закріплюють по одному розведенню і кожній тварині групи підшкірно вводять не більше 1.0 мл відповідного розведення. Одну групу тварин ви-

користовують як невакцинований контроль і кожній тварині цієї групи підшкірно вводять таку саму кількість розчинника. Через 28-32 доби проводять анестезію тварин і їх знекровлення, одержуючи індивідуальну сироватку від кожної миші. У кожній індивідуальній сироватці підходимо імунохімічним методом (2.7.1) кількісно визначають специфічні антитіла до вірусу гепатиту А.

**Розрахунки.** Розрахунок проводять звичайними статистичними методами для кількісного визначення з використанням методу пробітів (5.3).

Із розподілу рівнів реакцій, вимірених у всіх сироватках невакцинованої групи, визначають рівень максимальної реакції, яку можна очікувати у невакцинованої групи для даного конкретного випробування. Будь-яка відповідь вакцинованих тварин, що перевищує цей рівень, указує на сероконверсію.

Проводять підхоже перетворення відсотка тварин, що проявляють сероконверсію в кожній групі (наприклад, пробіт трансформацію), й аналізують результати відповідно до моделі паралельних ліній для log доза-відповідь. Визначають активність випробовуваного препарату відносно стандартного препарату.

**Умови придатності.** Результати випробування вважаються невірними, якщо:

- ED<sub>50</sub> для випробовуваної і стандартної вакцин не знаходиться між найменшою і найбільшою дозою, одержаною твариною;
- статистичний аналіз показує значні відхилення від лінійності або паралельності;
- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) менше 33 % і більше 300 % від установленної активності.

**Вимоги до активності.** Верхній довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленної відносної активності складає не менше 1.0.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ *IN VITRO*

Проводять імунохімічне визначення (2.7.1) вмісту антигена з валідованими критеріями прийнятності відносно *in vivo* випробування. Компетентний уповноважений орган затверджує критерії прийнятності для даного стандартного препарату, виходячи з результатів валідації.

**БСП вакцини для профілактики гепатиту А (інактивованої, неадсорбованої)** придатний для застосування як стандартний препарат.

### 2.7.15. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЕПАТИТУ В (рДНК)

Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) проводять або *in vivo* шляхом порівняння здатності вакцини та стандартного

препарату в певних умовах індукувати утворення специфічних антитіл проти поверхневого антигена (HBsAg) гепатиту В у мишей або мурчаків, або *in vitro* імунохімічним визначенням вмісту антигена.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ *IN VIVO*

**Вибір і розподіл випробовуваних тварин.** У випробуванні використовують здорових мишей одного приплоду близько п'яти тижневого віку. Лінія мишей, використовувана для цього випробування, має давати значний нахил у кривій доза-відповідь до антигена: придатними є миші з гаплотипом H-2<sup>a</sup> або H-2<sup>d</sup>. Здорові мурчаки одного приплоду масою від 300 г до 500 г (близько семитижневого віку) також вважаються придатними для випробування. Використовують тварин однієї статі. Тварин нарівно розподіляють у 7 груп, кількість тварин в яких відповідає вимогам випробування.

**Визначення активності випробовуваної вакцини.** Використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду Р, до складу якого входить ад'ювант, що містить алюміній, використаний у вакцині, готують не менше 3 розведень випробовуваної вакцини і відповідні розведення стандартного препарату. За кожною групою тварин закріплюють по одному розведенню і кожній тварині групи підшкірно вводять не більше 1.0 мл відповідного розведення. Одну групу тварин використовують як невакцинований контроль і кожній тварині цієї групи внутрішньочеревно вводять таку саму кількість розчинника. Після відповідного інтервалу часу (наприклад, від 4 до 6 тижнів) проводять анестезію тварин і їх знекровлення, одержуючи індивідуальну сироватку від кожної тварини. У кожній індивідуальній сироватці підходящим імунохімічним методом (2.7.1) кількісно визначають специфічні антитіла до HBsAg.

**Розрахунки.** Розрахунок проводять звичайними статистичними методами для кількісного визначення з використанням методу пробітів (5.3).

Із розподілу рівнів реакцій, виміряних у всіх сироватках невакцинованої групи, визначають рівень максимальної реакції, яку можна очікувати у невакцинованої групи для даного конкретного випробування. Будь-яка відповідь вакцинованих тварин, що перевищує цей рівень, указує на сероконверсію.

Проводять підхоже перетворення відсотка тварин, що проявляють сероконверсію в кожній групі (наприклад, пробіт трансформацію), й аналізують результати відповідно до моделі паралельних ліній для log доза-відповідь. Визначають активність випробовуваного препарату відносно стандартного препарату.

**Умови придатності.** Результати випробування вважаються невірними, якщо:

- ED<sub>50</sub> для випробовуваної і стандартної вакцин не знаходиться між найменшою і найбільшою дозою, отриманою твариною;

- статистичний аналіз показує значні відхилення від лінійності або паралельності;
- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) менше 33 % і більше 300 % від установленної активності.

**Вимоги до активності.** Верхній довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленної відносної активності складає не менше 1.0.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ *IN VITRO*

Проводять імунохімічне визначення (2.7.1) вмісту антигена з валідованими критеріями прийнятності відносно *in vivo* випробування.

Показано, що за підхожі методи можна вважати радіоімуноаналіз (PIA, RIA) й імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA), з використанням специфічних для індукуючих захисні епітопи HBsAg моноклональних антитіл. Використовують підхожу кількість розведень випробовуваної вакцини і стандартного препарату і застосовують модель паралельних ліній для аналізу результатів, які можуть бути відповідним чином перетворені. Комерційно доступні набори для вимірювання HBsAg *in vitro*, і можлива їх адаптація для застосування в *in vitro* кількісному визначенні активності.

Компетентний уповноважений орган затверджує критерії прийнятності для даного стандартного препарату, виходячи з результатів валідації.

*БСП вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) методом А1* БСП вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) методом В придатні для *in vitro* кількісного визначення певних вакцин, зазначених у супровідній документації БСП.

#### 2.7.24. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРІЯ

Проточна цитометрія складається із мультипараметричного аналізу оптичних властивостей окремих частинок у рідинній системі.

Клітини або частинки в суспензії поодиноці розподіляються у лінійному потоці та проходять через детектор. Тверді тканини для аналізу слід подрібнити до суспензії окремих клітин.

Спектр параметрів, вимірюваних проточною цитометрією, включає: об'єм і морфологічну складність клітин або структур, схожих на клітини; клітинні пігменти; вміст ДНК, РНК і білків; клітинні поверхневі маркери; внутрішньоклітинні маркери; ферментативну активність; рН; мембрани і плинність.

Можна одержувати два морфологічні параметри та один або більше флуоресцентні сигнали від однієї клітини. Мультипараметричний аналіз дозволяє визначити клітинні популяції за їх фенотипом.

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

### ОБЛАДНАННЯ

Фокусування, збільшення і вибір джерела світла оптимізовані, що дозволяє автоматично визначати і вимірювати морфологічні відмінності та забарвлення зразка. Аналіз проточною цитометрією має витримувати такі критерії:

- вибір джерела світла залежить від аналізованих параметрів;
- регулювання настроювань інструмента залежить від типу аналізованих клітин (наприклад, культура клітин, лейкоцити, тромбоцити, бактерії, сперматозоїди, дріжджі) і аналізу, що проводиться (наприклад, фенотипування, клітинний цикл, апоптоз, цитокіни, плинність мембран, флуоресцентний білок).

Проточна цитометрія характеризується автоматичним кількісним визначенням набору параметрів для великої кількості одиничних клітин при кожному аналізі. Наприклад, 100 000 частинок або більше (практично необмежена кількість) звичайно аналізуються по черзі приблизно за 1 хв. Межа детекції складає менше 100 флуоресцентних молекул на клітину.

Прилад проточного цитометра складається із 5 основних компонентів:

- рідинна система та проточна кювета;
- джерело світла;
- система детектора й аналогово-цифрового перетворювача (АЦП, ADC);
- система підсилення;
- комп'ютер із програмним забезпеченням для аналізу сигналів.

### РІДИННА СИСТЕМА ТА ПРОТОЧНА КЮВЕТА

Кожна клітина піддається дії джерела світла і детектується у проточній кюветі. Рідинна система переносить суспендовані окремі клітини поодинокі з пробовідбірника до лазерного відсіку. Для цього потік зразка рідким струменем у проточній кюветі витягується в дуже тонку рідку нитку (гідродинамічне фокусування). Промінь світла фокусується в еліпсоїдну форму двох кофокусних лінз у канал проточної кювети, через яку проходять клітини. Швидкість потоку має бути стабільною в процесі рутинного аналізу клітинних поверхневих маркерів і має забезпечувати підхожу відстань між клітинами для їх підрахунку.

### ДЖЕРЕЛА СВІТЛА

Звичайно використовують такі джерела світла:

- лампи (ртутні, ксенонові);
- потужні охолоджувані водою лазери (аргонові, криптонові, лазер на барвнику);
- малопотужні охолоджувані водою лазери (аргоновий (488 нм), червоний гелій-неоновий (633 нм), зелений гелій-неоновий, гелій-кадмієвий (УФ));

- діодні лазери (блакитний, зелений, червоний, фіолетовий).

### ДЕТЕКЦІЯ СИГНАЛУ

Коли частинка проходить через пучок світла, частина світла розсіюється на всі боки. Додані до частинок флуоресцентні барвники мають власне випромінювання (флуоресценція), яке також розсіюється на всі боки. Тому можуть утворюватися 2 типи сигналів:

- розсіювання світла;
- флуоресцентна емісія.

Світлові детектори приладу вловлюють частину розсіювання і флуоресцентного випромінювання і перетворюють на електронні сигнали пропорційно кількості вловленого світла.

**Розсіювання.** Вимірюють 2 параметри світлорозсіювання:

- кількість, в основному розсіяна вперед (пряме розсіювання (FS));
- кількість, розсіяна у напрямі 90° від напрямку пучка світла (бічне розсіювання (SS)).

Пряме розсіювання корелює з об'ємом клітин, тоді як на бічне розсіювання впливають такі параметри, як форма ядра, кількість і тип цитоплазматичних гранул або шорсткість мембран, і SS корелює з морфологічною складністю клітин: чим вища інтенсивність SS, тим складніша клітина. Як функція морфологічних характеристик клітин сигнали розсіювання завжди генеруються в ході проточних аналізів; вони називаються «внутрішніми параметрами».

**Флуоресценція.** Залежно від типу і кількості джерел світла при проходженні клітин через сенсорні зони вони випромінюють флуоресцентне світло. Флуоресцентні сигнали утворюють природні флуоресцентні барвники, присутні в клітинах (наприклад, коферменти, хлорофіл, пігменти морських водоростей), і/або флуоресцентні зонди, вставлені в клітини при забарвленні для аналізу специфічних характеристик (наприклад, флуоресцентні антитіла, барвники нуклеїнових кислот, рН-зонди, кальцієві зонди, флуоресцентні білки). У наш час доступна велика кількість і широка різноманітність різних типів флуоресцентних зондів. Оптичні фільтри мають бути адаптовані до використовуваних флуорохромів і замінюватися, якщо це необхідно. Кожен флуоресцентний зонд характеризується своїми спектрами збудження та емісії. Їх вибирають залежно від типу джерела збудження і системи детекції відповідно до специфічної мети аналізу.

### УПРАВЛІННЯ СИГНАЛОМ І АНАЛОГОВО-ЦИФРОВИЙ ПЕРЕТВОРЮВАЧ

Сигнали розсіювання і флуоресценції, що випромінюються клітинами при їх проходженні через лазерний пучок, сортуються і прямують до своїх детекторів, використовуючи оптичні фільтри. Де-

тектори — це датчики (фотопомножуючі трубки (ФПТ (PMTs)), які перетворюють випромінюваний клітинами світловий сигнал на імпульси напруги.

Процес підрахунку кожного імпульсу у відповідному каналі проводить аналогово-цифровий перетворювач (АЦП). У результаті процес подається як частотна гістограма.

**Підсилення.** Імпульси напруги вимагають підсилення для оптимальної візуалізації. Процес підсилення акцентує відмінності між клітинними сигналами і, отже, збільшує розділення серед популяції клітин із різними характеристиками (наприклад, диференціація життєздатних і нежиттєздатних клітин або неспецифічної флуоресценції від антиген-специфічної флуоресценції після забарвлення флуоресцентними моноклональними антитілами).

Існують 2 методи підсилення — лінійне і логарифмічне. Вибір між двома типами проводять для кожного одиничного сигналу, залежно від морфологічних властивостей клітин і використаних реактивів для забарвлення (наприклад, флуоресцентні моноклональні антитіла, барвники нуклеїнових кислот).

*Лінійне підсилення*, яке збільшує відмінності серед сильних імпульсів, використовується із тими параметрами, які генерують сигнали з високою інтенсивністю, наприклад:

- розсіювачі клітин;
- флуоресценція від барвників нуклеїнових кислот, використовуваних при вивченні клітинних циклів.

*Логарифмічне підсилення*, на відміну від попереднього типу, використовують для слабких імпульсів і параметрів або аналізів станів, які можуть утворити як слабкі, так і сильні імпульси, наприклад:

- клітинні антигени;
- розсіювання від тромбоцитів, бактерій, дріжджів;
- флуоресценція від барвників нуклеїнових кислот для вивчення апоптозів.

**Компенсація флуоресцентних сигналів.** Кожен флуоресцентний барвник має спектр довжин хвилі абсорбції і більший — випромінювання (емісії). При використанні для забарвлення клітин одночасно 2 або більше флуоресцентних зондів (наприклад, 4-антиген імунофенотипування) спектри випромінювання флуорохромів можуть перекриватися. Згодом кожен флуоресцентний детектор реєструватиме своє специфічне флуоресцентне випромінювання і варіабельну кількість випромінювання інших флуоресцентних зондів. Це призводить до переоцінки сигналу і поганого розділення клітинної популяції.

Рішення полягає у використанні електронної матриці, що дозволяє селективно розмежовувати взаємодіючі сигнали від кожного флуоресцентного сигналу після реєстрації детектором (компенсація флуоресценції).

Компенсація флуоресценції вимагає застосування флуоресцентних калібраторів; перевага надається позитивним клітинним зразкам, забарвленим відповідним флуорохромом, комбінованим з антитілами, що використовуються для аналізу.

### ГРАФІЧНЕ ЗОБРАЖЕННЯ І ВІЗУАЛІЗАЦІЯ СИГНАЛУ

Після підсилення і компенсації сигнали подаються у вигляді 2- або 3-мірних графіків. Гістограми показують інтенсивність сигналу відносно кількості клітин для зазначеного параметра. Цитограми, в яких кожна точка представляє одну клітину, є результатом комбінації двох сигналів (двопараметричні діаграми (дот-плоти)). Тип і кількість графіків і комбінацій сигналів вибирають на основі використаних зразків і барвників. При аналізі отриманих результатів програмним забезпеченням проточного цитометра можуть бути подані й інші види графіків (такі як накладки зображень, графічні тривимірні зображення, томограми, контурні зображення, графіки густини). Також можуть використовуватися статистичні результати, такі як середні флуоресцентні інтенсивності (та їх зміна в часі або їх залежність від функцій клітин).

### АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ

У випробовуваних клітинних суспензіях можуть бути присутні різні клітинні популяції, деякі з яких небажані (такі як неживі клітини, уламки клітин або макроагрегати) або просто непридатні для аналізу (наприклад, гранулоцити при дослідженні лімфоцитів). Це залежить від типу клітинних зразків (цільна кров, кістковий мозок, культури клітин, біологічні рідини, клітинні суспензії із твердих тканин) і методик їх обробки (наприклад, методи забарвлення, лізис, фіксація, кріозбереження, розморожування, залиті у парафін препарати тканин).

Як наслідок, не всі сигнали, що генеруються в процесі аналізу проточною цитометрією, належать клітинам, що вивчаються. Прийняті 2 стратегії з виключення небажаних і невідповідних клітинних сигналів.

Перша стратегія використовується при отриманні даних. Це шумовий поріг, який застосовується до одного (або більше) значущого параметра (параметрів), встановлений для виявлення лише тих клітин, інтенсивність сигналів яких вища, ніж заздалегідь визначена роздільна здатність для даного параметра. Завдяки своєму характерному сильному сигналу з низьким ступенем взаємодії найчастіше як дискримінатор використовують параметр прямого розсіювання.

Друга стратегія використовується при аналізі результатів і полягає у використанні регіонів для обмеження лише тих сигналів від популяцій, які задовольняють вимоги за певними морфологічними

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

і експресійними характеристиками. Звичайно використовують два типи логічних обмежень (гейтування). Перший — морфологічні обмеження (гейт). Клітинні популяції ідентифікують, використовуючи їх морфологічні сигнали (FS і SS). Гейт регіону встановлюють навколо потрібної популяції (наприклад, лімфоцити, життєздатні клітини), після чого флуоресцентні графіки відображають вибраний регіон. Другий — гейт, заснований на флуоресценції. Потрібну клітинну популяцію ідентифікують на основі інтенсивності експресії антигена або барвника, навколо цього встановлюють обмеження регіону. Після цього флуоресцентні графіки обмежуються вибраним регіоном.

Програмне забезпечення аналізу дозволяє створити безліч гейтованих регіонів, використовуючи послідовний логічний порядок. Ця властивість особливо корисна при вивченні рідкісних клітинних популяцій або при сортуванні.

### КОНТРОЛІ

**Внутрішній контроль.** Перед аналізом настроювання оптичної системи має бути валідоване з використанням підхожих флуоросфер і має бути перевірена оптимальна стабільність рідини. Отримані дані реєструють і періодично звіряють контрольні значення з середніми значеннями відтворюваності. Дуже актуальним є позитивний контроль для доказу того, що випробовувані антитіла функціональні та дозволяють відповідним чином налагодити проточний флуориметр. Позитивний контроль має включати зразки, які є позитивними маркерами для випробовуваного зразка.

**Зовнішній контроль.** Для гарантії надійності одержаних результатів або перевірки міжлабораторної відтворюваності рекомендується участь у дослідженнях з професійного тестування.

### 2.7.27. ЗНАЧЕННЯ ФЛОКУЛЯЦІЇ (Lf) ДИФТЕРІЙНОГО, ПРОТИПРАВЦЕВОГО ТОКСИНІВ ТА АНАТОКСИНІВ (КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗА РАМОНОМ/ПРОБА РАМОНА)

За допомогою методу кількісного визначення за Рамоном (проба Рамона) вміст токсину або анатоксину в зразку може бути виражений значенням флокуляції (Lf). Для випробування в ряд пробірок, що містять певну кількість токсину або анатоксину, по зростаючій концентрації додають антитоксин (сироватку). У точці еквівалентності токсину/анатоксину та анатоксину відбувається флокуляція в одній або декількох пробірках. Першу пробірку, в якій відбулася флокуляція, використовують для визначення значення Lf випробовуваного зразка.

Значення Lf токсину або анатоксину визначається кількістю одиниць антитоксину, яка при змішуванні зі зразком призводить до створення оптимально флокулюючої суміші (проба Рамона).

Досвід показав, що результати калібрування антитоксинів у Міжнародних одиницях (МО), наприклад, за міжнародними стандартними антитоксинами, залежать від використаного імунохімічного методу. Тому антитоксини, що використовуються для проби Рамона, мають бути калібровані за міжнародними біологічними стандартними препаратами для тесту на флокуляцію дифтерійного або протиравцевого анатоксину, використовуючи принципи, наведені нижче. Таким чином, концентрація може бути вказана в еквівалентах Lf на мілілітр (Lf-екв/мл).

Одна одиниця Lf — це кількість токсину або анатоксину, яка в найкоротший час флокулює з Lf-екв специфічного антитоксину.

У пробірки (наприклад, розміром (7x1) см) для флокуляції додають різні об'єми розчину 100 Lf-екв./мл стандартного препарату антитоксину. У кожен пробірку додають таку кількість розчину 9 г/л натрію хлориду Р, щоб отримати однаковий об'єм у всіх пробірках, наприклад, 1 мл. Випробовуваний зразок розводять для отримання очікуваної концентрації близько 50 Lf/мл та, наприклад, 1 мл аліквоти розведених зразків додають у кожен пробірку з антитоксином. Вміст пробірок ретельно перемішують струшуванням. Потім вміщують у водяну баню з постійною температурою від 30 °С до 52 °С. Через регулярний проміжок часу розглядають їх на виявлення перших ознак флокуляції. Для цього може бути потрібна лупа та сильне освітлення.

Позначають першу та другу пробірки зі сумішшю, в яких з'явилася флокуляція, та час, необхідний для цього. Флокуляція в двох пробірках може відбуватися одночасно.

Першою пробіркою, в якій відбулася флокуляція, вважається та, яка містить кількість антитоксину, найбільш близьку еквівалентній кількості антигена зразка. Вміст антитоксину в цій пробірці може бути використаний для розрахунку значення Lf зразка. Якщо флокуляція відбувається одночасно в двох пробірках, як результат випробування беруть їх середнє значення.

Час, необхідний для флокуляції у першій пробірці (Kf), є корисним індикатором якості антигена. Якщо при даній температурі та концентрації анатоксину та антитоксину значення Kf більше, ніж в нормі, це вказує на псування антигена. Значення Kf також змінюється в залежності від якості використаного антитоксину.

*Наприклад*

Пробірка	A	B	C	D	E	F
Доданий антитоксин (Lf-екв)	40	45	50	55	60	65
Доданий антитоксин (мл)	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65
Доданий розчин (мл)	0.60	0.55	0.50	0.45	0.40	0.35
Доданий розведений зразок	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Якщо в даному прикладі першою пробіркою, в якій відбулася флокуляція, є пробірка С, то значення Lf розведеної проби становить 50 Lf/мл. Однак, якщо першими пробірками, в яких відбулася флокуляція, є пробірки А та F, це не вказує на еквівалентний рівень. Необхідно провести повторне випробування або з іншим розведенням випробовуваного зразка, або підібрати інший діапазон доз стандартного антитоксину.

Більшої точності можна досягнути введенням запасу послідовностей флокуляції після першої пробірки. Так, у наведеному прикладі, якщо другою пробіркою, в якій відбулася флокуляція, є пробірка D, то кінцеве значення розведеної проби буде 52. У той час, якщо першою пробіркою, в якій відбулася флокуляція, була пробірка В, кінцеве значення буде 48. Випробування може проводитися в двох паралелях з трохи іншим розведенням випробовуваної проби.

Якщо немає вказівок про очікуване значення Lf випробовуваної проби, рекомендується до проведення кінцевого випробування провести грубу оцінку з більш широким діапазоном вмісту антитоксину в пробірках.

*Наприклад*

Пробірка	A	B	C	D	E	F
Вміст антитоксину (Lf-екв)	20	30	45	70	100	150

Вміст токсину або анатоксину та концентрацію антитоксину у випробуванні можна варіювати, але це значно впливає на час флокуляції. Так, для низьких концентрацій випробування надто затягнеться, в той час як для високих концентрацій флокуляція пройде дуже швидко і буде складно відрізнити першу та другу пробірки, в яких відбувається флокуляція.

#### Аналіз низьких концентрацій методом флокуляції суміші

Для дуже низьких концентрацій токсину або анатоксину перевагу вимірювання потрібно надавати методу флокуляції суміші. Це включає порівняння значення Lf відомого токсину або анатоксину з Lf суміші випробовуваного зразка з цим токсином або анатоксином.

Якщо проводять спільну флокуляцію для однорідних токсину або анатоксину з відомим значенням Lf та невідомим значенням Lf, суміш флокулює як сума їх значень. Якщо змішують неоднорідні токсини або анатоксини, вони дадуть змішену від норми криву з двома максимумами (піками).



## 2.8. МЕТОДИ ФАРМАКОГНОЗІЇ

### 2.8.18. ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В<sub>1</sub> У ЛІКАРСЬКІЙ РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:** афлатоксини є дуже токсичними і канцерогенними речовинами. Маніпуляції проводять під витяжною шафою, щоразу, коли це можливо. У зв'язку з тим, що токсини в сухому стані мають електростатичні властивості і здатність розсіватися в робочому середовищі, необхідні особливі заходи безпеки, такі, як використання рукавичного боксу. Міжнародним Агентством з вивчення раку (IARC) розроблені процедури дезактивації для лабораторних відходів афлатоксинів.

Афлатоксини — це мікотоксини природного походження, що продукуються, головним чином, *Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus*. Ці гриби або поширені, або широко поширені в природі і найчастіше виявляються там, де певні злаки ростуть у поганих умовах, таких як посуха. Плісневий грибок утворюється в ґрунті, гниючих овочах, сіні і зерні, схильному до мікробного псування, і вражає всі типи органічних речовин щоразу, коли і де є сприятливі умови для їх зростання. Підходящими умовами є високий вміст вологості і висока температура. Як мінімум 13 різних типів афлатоксинів утворюється в природі, і найбільша кількість з них відомі як високотоксичні і канцерогенні. Афлатоксин В<sub>1</sub> вважається найбільш токсичним. Для лікарської рослинної сировини, схильної до контамінації афлатоксинами, проводять випробування на вміст афлатоксину В<sub>1</sub> валідованим методом.

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, лікарська рослинна сировина не має містити більше 2 мкг/кг афлатоксину В<sub>1</sub>. Компетентний уповноважений орган може також зажадати відповідність межі вмісту суми афлатоксинів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> і G<sub>2</sub> — 4 мкг/кг.

Методика, описана нижче, наводиться як приклад методики, яка показала придатність для коренів жовтецю, імбиру і плодів касії. Її придатність для іншої лікарської рослинної сировини має бути продемонстрована або має використовуватися інша валідована методика.

#### МЕТОДИКА

##### Рідинна хроматографія (2.2.29)

Афлатоксини розкладаються під дією світла. Визначення проводять у захищеному від денного світла місці з використанням поглинаючої ультрафіолет фольги на вікнах у поєднанні з приглушеним освітленням або завіси, або ширми у поєднанні зі штучним освітленням (придатні лампи денного світла). Розчини, що містять афлатоксин, захищають від денного світла.

Скляний посуд обполіскують перед використанням розчином 10 % (об/об) кислоти сірчаної Р і потім обполіскують обережно водою дистильованою Р до відсутності кислоти.

**Випробовуваний розчин.** Використовують імуноафінну колонку, яка містить антитіла до афлатоксину В<sub>1</sub> з навантажувальною ємністю не менше 100 нг афлатоксину В<sub>1</sub> і яка дає відношення «введено/знайдено» не менше 80 % при пропусканні через колонку розчину 5 нг афлатоксину В<sub>1</sub> у суміші 12.5 мл метанолу Р і 87.5 мл води Р. Імуноафінну колонку витримують до досягнення кімнатної температури. До 5.00 г подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини (500) (2.9.12) додають 100 мл суміші вода Р - метанол Р (30:70) і екстрагують з використанням ультразвуку протягом 30 хв. Фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр. Відміряють піпеткою 10.0 мл прозорого фільтрату в конічну колбу місткістю 150 мл. Додають 70 мл води Р. Пропускають 40 мл одержаного розчину через імуноафінну колонку зі швидкістю потоку 3 мл/хв (не більше 5 мл/хв). Колонку промивають водою Р двічі, об'ємами по 10 мл, при швидкості потоку не більше 5 мл/хв і висушують із використанням слабого вакууму протягом 5-10 сек або, пропускаючи повітря через імуноафінну колонку, використовуючи шприц, протягом 10 сек. 0.5 мл метанолу Р вводять у колонку і дають можливість розчиннику пройти через колонку під дією сили тяжіння. Елюат збирають у мірну колбу місткістю 5 мл. Через 1 хв вводять другу порцію 0.5 мл метанолу Р. Через 1 хв — третю порцію 0.5 мл метанолу Р. Більшу частину використаного елюату збирають, використовуючи тиск повітря через колонку або вакуум. Зібраний розчинник розводять водою Р до 5 мл і добре струшують. Якщо розчин прозорий, він може безпосередньо використовуватися для аналізу. А коли ні розчин до інжекції пропускають крізь одноразовий передфільтр. Використовують одноразовий фільтр (наприклад, політетрафторетиленовий фільтр з розміром пір 0.45 мкм), для якого показана відсутність зменшення концентрації афлатоксину за рахунок утримування фільтром.

**Первинний вихідний розчин афлатоксину В<sub>1</sub>.** Афлатоксин В<sub>1</sub> Р розчиняють у суміші: ацетонітрил Р — толуол Р (2:98) до отримання розчину 10 мкг/мл. Для визначення точного значення концентрації афлатоксину В<sub>1</sub> у вихідному розчині записують спектр поглинання (2.2.25) в інтервалі від 330 нм до 370 нм, використовуючи кварцові кювети.

Масову концентрацію афлатоксину В<sub>1</sub>, у мікрограмах на мілілітр, розраховують, використовуючи таку формулу:

$$\frac{A \times M \times 100}{\epsilon \times l}$$

де:

A — оптична густина, визначена в максимумі абсорбції;

$M$  — молярна маса афлатоксину  $B_1$  (312 г/моль);  
 $\varepsilon$  — молярний показник поглинання афлатоксину  $B_1$  у суміші толуол-ацетонітрил (1930 м<sup>2</sup>/моль);  
 $l$  — довжина оптичного шляху кювети (1 см).

**Вторинний вихідний розчин афлатоксину  $B_1$ .** Готують вторинний вихідний розчин, що містить 100 нг/мл афлатоксину  $B_1$ , шляхом розведення первинного вихідного розчину сумішшю: ацетонітрил  $P$  — толуол  $P$  (2:98). Колбу щільно загортають алюмінієвою фольгою і зберігають при температурі менше 4 °С. Перед використанням, не знімаючи алюмінієвої фольги, витримують колбу при кімнатній температурі до досягнення вмістом колби кімнатної температури. Якщо розчин зберігався тривалий час (наприклад, 1 міс), зважують колбу і відзначають масу до і після використання розчину.

**Стандартні розчини афлатоксину  $B_1$ .** Поміщають об'єми вторинного розчину афлатоксину, зазначені в Табл. 2.8.18.-1, в окремі мірні колби місткістю 250 мл. Пропускають потік азоту при кімнатній температурі до майже повного випарування розчинника. У кожену колбу додають 75 мл метанолу  $P$ , дають афлатоксину  $B_1$  розчинитися і розводять водою  $P$  до 250 мл.

Таблиця 2.8.18.-1  
Стандартні розчини афлатоксину  $B_1$

Стандартний розчин	Об'єм вторинного вихідного розчину (мкл)	Кінцева концентрація стандартного розчину (нг/мл)
1	125	0.05
2	250	0.1
3	500	0.2
4	750	0.3
5	1000	0.4

**Калібрувальна крива.** Будують калібрувальну криву, використовуючи стандартні розчини афлатоксину  $B_1$  від 1 до 5, які покривають діапазон, еквівалентний від 1 мкг/кг до 8 мкг/кг афлатоксину  $B_1$  у рослинній лікарській сировині. Перевіряють лінійність отриманої залежності. Якщо вміст афлатоксину  $B_1$  у випробовуваному зразку знаходиться за межами діапазону калібрування, випробовуваний розчин має бути розведений до вмісту афлатоксину, який підходить для прийнятої калібрувальної кривої.

**Колонка:**

- розмір:  $l = 0.25$  м,  $\varnothing = 4.6$  мм;
- нерухома фаза: октадецилсилілікагель для хроматографії  $P$  (5 мкм).

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А (для післяколонкової дериватизації з фотохімічним реактором або піридиній бромідом): ацетонітрил  $P$  - метанол  $P$  - вода  $P$  (2:3:6) (об/об/об);
- рухома фаза В (для післяколонкової дериватизації з електрохімічно отриманим бромідом): додають 0.12 г калію броміду  $P$  і 350 мкл кислоти азотної розведеної  $P$ 1 на літр рухомої фази А.

**Швидкість потоку:** 1 мл/хв.

**Детектування:** флуоресцентний детектор з довжиною хвилі збудження 360 нм і довжиною хвилі емісії 420 нм або аналогічні. Для регульованих детекторів рекомендуються довжина хвилі збудження 365 нм і довжина хвилі емісії 435 нм.

**Інжекція:** 500 мкл.

**Післяколонкова дериватизація з піридинію гідробромідом пербромідом (PBPB):**

- насос з низьким рівнем пульсації;
- трійник з нульовим мертвим об'ємом;
- політетрафторетиленова реакційна трубка,  $l = 0.45$  м,  $\varnothing = 0.5$  мм;
- рухома фаза А;
- реактив для післяколонкової дериватизації: розчиняють 50 мг піридинію гідробромідом пербромідом  $P$  в 1000 мл води  $P$  (зберігають у захищеному від світла місці і використовують протягом 4 діб);
- швидкість потоку реактиву для дериватизації: 0.4 мл/хв.

**Післяколонкова дериватизація з використанням фотохімічного реактора (PHRED):**

- реактор з однією 254 нм ртутною УФ лампою низького тиску (не менше 8 Втг);
- опорна шліфована плита;
- реактор є котушкою - політетрафторетиленовою трубкою, що щільно обв'язана навколо УФ лампи,  $l = 25$  м,  $\varnothing = 0.25$  мм, об'єм порожнини 1.25 мл;
- час експозиції: 2 хв;
- рухома фаза А.

**Післяколонкова дериватизація з використанням електрохімічно генерованого бромідом (KOBRA):**

- комірка-KOBRA: електрохімічна комірка, що генерує реакційноздатну форму бромідом для дериватизації афлатоксинів, що сприяє зростанню флуоресценції; використовують підходу з численності комерційно доступних;
- джерело постійного струму постачається в комплекті з коміркою-KOBRA, що забезпечує постійний струм близько 100 мкА;
- поліфторетиленова реакційна трубка,  $l = 0.12$  м,  $\varnothing = 0.25$  мм;
- рухома фаза В.

**Послідовність елювання:** афлатоксин  $G_2$ , афлатоксин  $G_1$ , афлатоксин  $B_2$ , афлатоксин  $B_1$ .

**Розрахунок:** розраховують калібрувальну залежність  $y = ax + b$ , з концентрацією афлатоксину  $B_1$  (нг/мл) на осі абсцис і відгуком ( $S$ ) на осі ординат. Концентрація афлатоксину  $B_1$  ( $C$ ) у зміряному розчині еквівалентна:

$$\frac{S - b}{a}$$

Вміст афлатоксину  $B_1$  у лікарській рослинній сировині, в нг/г, розраховують, використовуючи таку формулу:

## 2.8. Методи фармакогнозії

$$\frac{I_1 \times V_2 \times C}{m \times I_2}$$

де:

$m$  — маса лікарської рослинної сировини, узята для випробування, в г;

$V_1$  — об'єм розчинника, використований для екстракції, в мл;

$V_2$  — аліквота, узята для імуноафінного очищення, в мл;

$V_3$  — кінцевий об'єм розчину після елюювання з імуноафінної колонки і розведення, в мл.

$C$  — концентрація афлатоксину  $B_1$ , визначена у випробовуваному розчині, в нг/мл.

Наявність афлатоксину  $B_1$  може бути підтверджена шляхом реєстрації хроматограм без післяколонкової дериватизації, що дає значне зменшення (більше як у 10 разів) чутливості визначення для афлатоксину  $B_1$ .

**N**

Для визначення вмісту як афлатоксину  $B_1$ , так і суми афлатоксинів  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  і  $G_2$  допускається використання інших валідованих методик.

### 2.8.20. ЛІКАРСЬКА РОСЛИННА СИРОВИНА: ВІДБІР ПРОБ І ПРОБОПІДГОТОВКА

Щоб зменшити вплив відбору проб при проведенні якісного і кількісного аналізу, необхідно забезпечити репрезентативність складу випробовуваного зразка випробовуваної партії лікарської рослинної сировини (ЛРС). Методики, зазначені в даній статті, представляють мінімальні вимоги, які вважаються за прийнятні для ЛРС. **ПРИМІТКА:** також можуть бути використані інші методики за умови підтвердження, що вони дозволяють отримувати репрезентативні зразки даної партії.

#### ПЕРВИННА ПРОБА

Якщо зовнішній огляд контейнерів, маркувань, етикеток партії свідчить про її однорідність, проводять вибірку контейнерів за випадковою схемою, у кількості, зазначеній нижче. Якщо партію не можна вважати за однорідну, проводять її ділення на декілька можливо однорідніших частин. Потім, як і у разі однорідної партії, з кожної із частин партії проводять вибірку контейнерів за випадковою схемою, у кількості, як мінімум, зазначеній нижче.

Кількість контейнерів у партії (N)	Кількість контейнерів у партії, що підлягають відбору проб (n)
1-3	усі
>3	$n^* = \sqrt{N+1}$

\* — округляють  $n$  до найближчого цілого числа.

Беруть по одній пробі з кожного контейнера, призначеного для відбору проб. Вибірку проводять з

верхньої, середньої і нижньої частин контейнера так, щоб відібрані проби були репрезентативними для різних частин контейнера. У разі крупних контейнерів (ящики або мішки) вибірку проб проводять на глибині не менше 10 см. Маса матеріалу, відібраного з кожного контейнера, має бути такою, щоб загальна маса первинної проби відповідала значенням, зазначеним нижче:

Маса ЛРС у партії (кг)	Мінімальна маса проб у відсотках від маси партії ЛРС
< 50	1.00*
50-100	0.50
>100-250	0.25
> 250-500	0.20
> 500-1000	0.18
>1000-2500	0.15
> 2500-5000	0.10
> 5000-10 000	0.08
> 10 000-25 000	0.05

**ПРИМІТКА:** якщо маса партії більше 25 000 кг, партію ділять на частин і використовують методику для кожної частини партії, як і у разі однорідної партії;

\* — з урахуванням того, що мінімальна загальна маса первинної проби 125 г; якщо цей необхідний мінімум складає більше 10.0 % маси ЛРС у партії, то вся партія може бути використана як проба.

Первинну пробу готують шляхом об'єднання і ретельного перемішування проб з кожного вибраного за випадковою схемою контейнера (див. Табл. 2.8.20.-1).

#### ВИПРОБОВУВАНИЙ ЗРАЗОК

Якщо немає інших зазначень в окремій статті, випробовуваний зразок готують, як зазначено нижче.

Розмір первинної проби зменшують шляхом квартування (Див. «Примітка» нижче) або будь-яким іншим способом, що дозволяє отримати гомогенний зразок, упевнюючись у тому, що кожна відібрана порція залишається репрезентативною для всієї проби. Повторюють процедуру квартування, доки для мінімальної кількості, що залишилася, не виконуватимуться такі умови.

Вид ЛРС	Мінімальна маса випробовуваного зразка
Коріння, кореневища, кора, трава	500 г або маса всієї проби, якщо первинна проба має масу менше 500 г
Листя, квітки, насіння, плоди	250 г або маса всієї проби, якщо первинна проба має масу менше 250 г
Подрібнена або фрагментована ЛРС (середня маса частин менше 0.5 г)	125 г

**ПРИМІТКА:** квартування полягає в тому, що ретельно перемішану первинну пробу поміщають рівномірним

Схема відбору проб для отримання необхідної первинної проби

Маса ЛРС у контейнері (кг)		0.5			1			5		
Загальна маса ЛРС у партії (кг)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	
0.5	1	1	125	-	-	-	-	-	-	
1	2	2	125	1	1	125	-	-	-	
5	10	5	125	5	4	125	1	1	125	
10	20	6	125	10	5	125	2	2	125	
25	-	-	-	25	6	250	5	4	250	
100	-	-	-	100	11	500	20	6	500	
250	-	-	-	-	-	-	50	9	625	
500	-	-	-	-	-	-	100	11	1000	
Маса ЛРС в контейнері (кг)	25			125			500			
Загальна маса ЛРС у партії (кг)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	Кількість контейнерів у партії	Кількість контейнерів для відбору проб	Загальна маса проб (г)	
25	1	1	250	-	-	-	-	-	-	
100	4	3	500	-	-	-	-	-	-	
250	10	5	625	2	2	625	-	-	-	
500	20	6	1000	4	3	1000	1	1	1000	
1000	40	8	1800	8	4	1800	2	2	1800	
2000	80	10	3000	16	5	3000	4	3	3000	
3000	120	12	3000	24	6	3000	6	4	3000	
5000	200	16	5000	40	8	5000	10	5	5000	
10 000	400	21	8000	80	10	8000	20	6	8000	
20 000	800	30	12 500	160	14	12 500	40	8	12 500	

шаром у формі квадрата і ділять її по діагоналі на 4 рівних частини. 2 протилежні чверті залишають і повторно ретельно перемішують. Процес, якщо необхідно, повторюють до отримання випробовуваного зразка необхідної мінімальної маси.

Випробовуваний зразок подрібнюють, одноразово пропускаючи його крізь сито з розміром отвору 1 мм або розміром, зазначеним в окремій статті. Рекомендується використовувати апарат для подрібнення.

Подрібнений випробовуваний зразок просівають крізь стандартне сито з розміром отвору 1 мм або крізь сито, зазначене в окремій статті. Залишок на ситі має бути не більше як 10 % від загальної маси подрібненого зразка, зокрема в ньому можуть бути не більше 2 % від загальної маси подрібненого зразка частинок розміром більше 1.5 мм або тих, що в 1.5 рази перевищують розмір, зазначений в окремій статті. При відповідності зазначеним вимогам зразок і залишок слід добре перемішати для отримання випробовуваного зразка для аналізу.

При невідповідності зазначеним вимогам для отримання випробовуваного зразка об'єднують 2 частини, зважених окремо; таким чином, для кожного аналізу беруть наважку, що є сумішшю пропорційних кількостей просіяної частини і залишку на ситі.

**ПРИМІТКА:** для визначення мікроскопічних властивостей частину подрібненого випробовуваного зразка повторно подрібнюють і знову просівають крізь сито з розміром отвору 0.355 мм.

### 2.8.23. МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Для мікроскопічного дослідження використовують подрібнені в порошок зразки лікарської рослинної сировини (355) (2.9.12), якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Найчастіше використовуваний реактив - розчин хлоралгідрату Р. Проте після використання даного реактиву як включаючої рідини певні ознаки не виявляються або слабо помітні. У цьому разі використовують інші реактиви, наприклад, розчин 50 % (об/об) гліцерину Р, який дає можливість виявити крохмальні зерна. В окремій статті також може знадобитися зазначення специфічного реактиву, використовуваного для виявлення різних ознак, наприклад: реактиву кислоти молочної Р, 10 % (об/об) спиртового розчину фтороглюцину Р і кислоти хлористоводневої Р, використовуваних для якісної реак-

## 2.8. Методи фармакогнозії

ції на лігнін у клітинах або тканинах, *розчину рутенію червоного Р*, використовуюваного для підтвердження присутності слизу у клітинах, або *гліцерину Р*, використовуюваного для виявлення крохмальних зерен.

Для ідентифікації крохмальних зерен (феномен чорного перетинання), кристалів кальцію оксалату (світлозаломлювання) або здерев'янілих структур використовують дослідження в поляризованому світлі (між схрещеними призмиами (ніколями)).

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ РОЗЧИНУ ХЛОРАЛГІДРАТУ

2-3 краплі *розчину хлоралгідрату Р* поміщають на предметне скло. Невелику кількість порошку рослинної лікарської сировини вміщують у даний розчин і накривають покривним склом. Дуже обережно нагрівають препарат до кипіння на гарячій плитці або на мікрогазовому пальнику. Підтримують слабе кипіння протягом нетривалого часу. Переконаються, що кількість розчину, використовуюваного як включаючу рідину, достатня. Якщо необхідно, додають більше розчину, використовуючи скляну піпетку з тонковідтягненим кінчиком. Препарат залишають до охолодження, потім переглядають під мікроскопом. Повторюють нагрівання, доки крохмальні зерна і водорозчинні компоненти клітин стануть невидимі. Переглядають під мікроскопом.

Хлоралгідрат має тенденцію кристалізуватися у вигляді довгих голок. Для того, щоб уникнути цього, проводять таке: після нагрівання знімають покривне скло; до препарату додають 1 краплю суміші 10 % (об/об) *розчину хлоралгідрату Р* у *гліцерині Р*; накривають препарат чистим покривним склом; переглядають під мікроскопом.

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ РОЗЧИНУ 50 % (об/об) ГЛІЦЕРИНУ

2 краплі розчину 50 % (об/об) *гліцерину Р* поміщають на предметне скло. Невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини вміщують у даний розчин і накривають покривним склом. Переглядають під мікроскопом.

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ СПИРТОВОГО РОЗЧИНУ 10 % (об/об) ФЛОРОГЛЮЦИНУ І КИСЛОТИ ХЛОРИСТОВОДНЕВОЇ

Невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини поміщають на предметне скло. Додають 1-2 краплі 10 % (об/об) *спиртового розчину флороглюцину Р*. Перемішують і витримують до майже повного випарування розчинника. Додають 1-2 краплі *кислоти хлористоводневої Р* і накривають

препарат покривним склом. негайно переглядають під мікроскопом. Червоне забарвлення свідчить про наявність лігніну.

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ РЕАКТИВУ КИСЛОТИ МОЛОЧНОЇ

2-3 краплі *кислоти молочної реактиву Р* поміщають на предметне скло. Вміщують невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини в рідину на предметному склі і накривають препарат покривним склом. Препарат дуже обережно нагрівають до кипіння. Підтримують слабе кипіння нетривалий час. Переконаються, що кількість включаючої рідини достатня. Якщо необхідно, додають більше розчину, використовуючи скляну піпетку з тонковідтягненим кінчиком. Препарат залишають до охолодження і потім переглядають під мікроскопом. Здерев'янілі структури стають коричнево-жовтими; структури, що містять целюлозу, залишаються безбарвними. Крохмальні зерна набувають фіолетового забарвлення різної інтенсивності; певні секрети (наприклад, ефірні масла, смоли, бальзами) стають жовтогарячими, пробка набуває червоного забарвлення.

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ РОЗЧИНУ РУТЕНІЮ ЧЕРВОНОГО

2 краплі *розчину рутенію червоного Р* поміщають на предметне скло. Невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини вміщують у рідину і накривають препарат покривним склом. Через близько 1 хв краплю *води дистильованої Р* пропускають між предметним і покривним склом. Переглядають під мікроскопом. Слиз набуває фіолетово-червоного забарвлення.

N

Для мікроскопічного дослідження використовують подрібнені на порошок зразки сухої лікарської рослинної сировини (355) (2.9.12), якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Попереднє розмочування сировини виключається; якщо необхідно, допускається нетривала витримка сировини у вологій камері.

### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ 96 % СПИРТУ

2-3 краплі 96 % *спирту Р* поміщають на предметне скло. Невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рослинної сировини вміщують у рідину на предметному склі і накривають препарат покривним склом. У клітинах спостерігаються сферокристали

інуліну, що випали після осадження спиртом, добре сформовані, округлі, зазвичай прилегли до клітинної оболонки. Вони мають променево-радіальну будову з концентричною шаруватістю.

#### ПРИГОТУВАННЯ МІКРОПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ СПИРТОВОГО РОЗЧИНУ 20 % (об/об) $\alpha$ -НАФТОЛУ

1-2 краплі розчину 20 % (об/об)  $\alpha$ -нафтолу *P* у 96 % спирті *P* поміщають на предметне скло. Невелику кількість подрібненої на порошок лікарської рос-

линної сировини вмішують у рідину на предметному склі і накривають препарат покривним склом. Потім під покривне скло вводять 1-2 краплі *кислоти сірчаної P*. Переглядають під мікроскопом. Клітини, що містять інулін, забарвлюються в рожево-фіолетовий колір (реакція Моліша). При заміні  $\alpha$ -нафтолу *P* тимолом *P* утворюється червоне забарвлення. Ці самі реакції дають і інші вуглеводні, наприклад, крохмаль. Тому реакцію Моліша використовують для визначення інуліну після попередньої негативної якісної реакції на крохмаль у випробовуваній лікарській рослинній сировині.

## 2.9. ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ

### 2.9.33. ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ КРИСТАЛІЧНИХ І ЧАСТКОВО КРИСТАЛІЧНИХ ТВЕРДИХ РЕЧОВИН МЕТОДОМ РЕНТГЕНІВСЬКОЇ ДИФРАКЦІЇ ПОРОШКУ (РДП)

Кожна кристалічна фаза вихідної речовини має свою характерну рентгенівську дифрактограму.

Дифрактограма (рентгенограма порошку) може бути отримана, виходячи з довільно орієнтованого кристалічного порошку, який складається з кристалітів або фрагментів кристала певного розміру. По суті, три типи інформації може бути одержано з дифрактограми порошку: кутове положення дифракційних ліній (залежить від геометрії та розміру елементарної комірки), інтенсивність дифракційних ліній (залежить в основному від типів атомів і їх розташування в елементарній комірці, а також від орієнтації частинок зразка); профіль дифракційних ліній (залежить від розділення приладу, розмірів кристалітів, напруги і товщини зразка).

Результати експерименту з визначення кутових положень й інтенсивностей ліній можуть бути використані для якісного фазового аналізу (наприклад, ідентифікація кристалічних фаз) і кількісного фазового аналізу кристалічних матеріалів. Крім того, ці дослідження дають можливість оцінити співвідношення<sup>(1)</sup> аморфної і кристалічних фаз зразка.

Рентгенівська дифракція порошку (РДП, XRPD) має перевагу перед іншими методами аналізу, оскільки цей метод не є руйнівним за своєю природою (пробопідготовка зводиться до подрібнення зразка, щоб забезпечити хаотичний розподіл орієнтацій кристалітів у зразку). Дослідження РДП можуть бути проведені також в умовах *in situ* на зразках, що піддаються впливу нестандартних умов навколишнього середовища, таких як високі або низькі температури і вологість.

#### ПРИНЦИП

Рентгенівська дифракція заснована на принципі взаємодії рентгенівського випромінювання з електронними хмарами атомів. Залежно від розташування атомів інтерференція посилюється порівняно з розсіяними рентгенівськими променями. Ці інтерференції спостерігаються, коли різниця в довжинах шляху двох рентгенівських променів кратна цілому числу довжин хвиль. Це правило відбору описується

(1) Є багато інших застосувань методу рентгенівської дифракції порошку для аналізу фармацевтичних субстанцій, таких як визначення кристалічної структури, уточнення кристалічної структури, визначення кристаліграфічної чистоти кристалічних фаз, характеристика текстурування тощо. Ці застосування не описані в цій статті.

рівнянням Брегга, яке також називається законом Брегга (див. Рис. 2.9.33.-1):

$$2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} = n\lambda$$

Довжина хвилі  $\lambda$  рентгенівського випромінювання має бути того самого порядку, що і відстань між паралельними площинами кристалічних ґрат, або  $d_{hkl}$  (по-іншому — « $d$ -відстань»).  $\theta_{hkl}$  — це кут між первинним рентгенівським променем і рядом паралельних площин кристалічних ґрат, а величина  $\sin\theta_{hkl}$  обернено пропорційна відстані між паралельними площинами кристалічних ґрат, або  $d$ -відстані.

Напрямок і розташування площин відносно елементарної комірки визначаються індексами Міллера  $\{hkl\}$ . Індеси Міллера — це еквівалентні відрізки, округлені до найменших цілих чисел, які атомні площини відсікають на координатних осях елементарної комірки. Параметри елементарної комірки описуються відстанями  $a$ ,  $b$ ,  $c$  і кутами між ними  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ .

Міжплощинні відстані для певного набору паралельних  $hkl$  площин позначаються  $d_{hkl}$ . Кожна така сім'я площин може давати вищі порядки дифракції, при цьому величина  $d$  для сімей площин  $nh$ ,  $nk$ ,  $nl$  зменшується на фактор  $1/n$ , де  $n$  — ціле число (наприклад, 2, 3, 4 і так далі).

Кожен набір атомних площин усередині кристала має свою характерну величину кута дифракції Брегга,  $\theta_{hkl}$  (для певної довжини хвилі  $\lambda$ ).

Порошкоподібний зразок передбачає полікристалічність, при цьому при будь-якому куті  $\theta_{hkl}$  завжди є кристаліти, орієнтація яких дозволяє дифракцію, оскільки підкоряється закону Брегга<sup>(2)</sup>. Для певної довжини хвилі положення дифракційних піків (по-іншому «ліній», «рефлексів» або «рефлексів Брегга») є характеристиками кристалічних ґрат ( $d$ -відстані), їх теоретичні інтенсивності залежать від вмісту кристаліграфічної елементарної комірки (природи і положення атомів), а лінійні профілі — від досконалості та деформацій кристалічних ґрат.

За цих умов дифракційний пік має кінцеву інтенсивність, яка є результатом розташування атомів, типів атомів, їх теплового руху та структурних дефектів, а також залежить і від характеристик обладнання.

Інтенсивність залежить від багатьох факторів, таких як структурний фактор, температурний фактор, кристалічність, фактор поляризації, мультиплетність і фактор Лоренца.

Положення  $2\theta$ , висота піка, площа піка і його форма (описується, наприклад, шириною піка або асиметрією, аналітичною функцією, емпіричним

(2) «Ідеальний» порошок для дифракційних експериментів складається з великої кількості маленьких, довільно орієнтованих сферичних кристалітів (що когерентно відображають кристалічні домени). Якщо їх кількість досить велика, то завжди достатньо кристалітів із будь-якою дифракційною орієнтацією для отримання відтворених дифрактограм.

уявленням (зображенням) – це основні характеристики профілю дифракційної лінії. Приклади типів дифрактограм п'яти різних твердих форм однієї субстанції наведені на Рис. 2.9.33.-2.

Окрім дифракційних піків, експеримент з рентгенівської дифракції також генерує рівномірний фон, на який накладаються ці піки. Окрім пробопідготовки, на рівень фону також впливають інші фактори, наприклад тримач для зразка, дифузне розсіювання від повітря і частин обладнання, параметри приладу, такі як шум детектора, загальне випромінювання рентгенівської трубки та ін. Співвідношення сигнал/шум може бути покращене при збільшенні часу витримки.

## ОБЛАДНАННЯ

**Прилад.** Експерименти з рентгенівської дифракції звичайно проводять за допомогою порошкових дифрактометрів або порошкових камер.

Порошковий дифрактометр звичайно складається із п'яти основних частин: джерела рентгенівського випромінювання; оптики падаючого пучка, яка може проводити монохроматизацію, фільтрацію, колімацію і/або фокусування рентгенівського пучка; гоніометра; оптики дифрагованого пучка, яка також може проводити монохроматизацію, фільтрацію, колімацію і фокусування або паралелізування рентгенівського пучка; детектора. Також необхідні системи для збору й обробки даних, які звичайно входять до складу сучасних дифрактометричних систем.

Залежно від необхідного типу аналізу (фазова ідентифікація, кількісний аналіз, визначення параметрів ґрат і так далі), потрібні різні конфігурації, з різними

характеристиками обладнання РДП. Найпростіші прилади, які застосовуються для запису дифрактограм, – це порошкові камери. Заміна фотоплівки як детектора випромінювання призвела до розробки дизайну дифрактометра, в якому геометричне розташування оптики не істинно фокусує, а парафокусує, як у геометрії Бреґга-Брентано. Парафокусуєча конфігурація Бреґга-Брентано зараз найбільш поширена, тому стисло тут і наведена.

Даний прилад може бути конфігурований у горизонтальній або вертикальній  $\theta/2\theta$  або  $\theta/\theta$  геометрії. В обох геометріях падаючий пучок рентгенівських променів утворює кут  $\theta$  з поверхнею зразка, а дифрагований пучок утворює кут  $2\theta$  із напрямом падаючого пучка (і кут  $\theta$  із площиною поверхні зразка). Базова геометрична конфігурація наведена на Рис. 2.9.33.-3. Розбіжний пучок випромінювання від рентгенівської трубки (по-іншому називається «первинний пучок») проходить через коліматор, що складається із паралельних пластин (щілини Соллера) і набору щілин розбіжності, після цього освітлює плоску поверхню зразка. Усі промені, дифраговані підхоже орієнтованими кристалітами в зразку при куті  $2\theta$ , сходяться в лінію на приймальній щілині. Другий набір коліматорів паралельних пластин і розсіююча щілина можуть бути розміщені або перед, або після приймальної щілини. Осі лінійного фокуса рентгенівської трубки і приймальної щілини знаходяться на однаковій відстані від осі гоніометра. Рентгенівські кванти детектують детектором випромінювання – звичайно сцинтиляційним лічильником, запаяним газонаповненим пропорційним лічильником або позиційно чутливим твердотільним детектором типів ПЗС (CCD) або «Imaging Plate». Набір приймальних щілин і детектор жорстко зв'язані між собою і переміщуються тангенціально до фокусуєчого кола. У геометрії  $\theta/2\theta$  при  $\theta/2\theta$  ска-

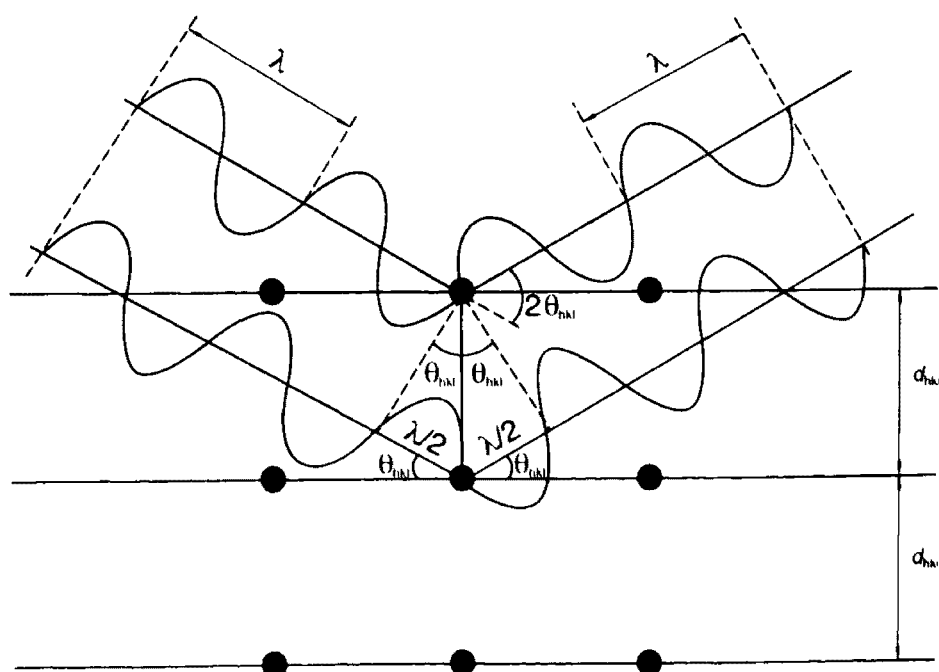


Рисунок 2.9.33.-1. Рентгенівська дифракція кристалами згідно закону Бреґга



## 2.9. Фармако-технологічні випробування

нуванні гоніометр обертає зразок навколо тієї самої осі, що і детектор, тільки зі швидкістю у два рази меншою, ніж детектор, щоб збереглася умова  $\theta/2\theta$ . У геометрії  $\theta/\theta$  при  $\theta/2\theta$  скануванні гоніометр обертає рентгенівську трубку і детектор у протилежних напрямках навколо своєї осі з тією самою швидкістю, а зразок залишається нерухомим. При цьому поверхня зразка завжди залишається тангенціальною до фокусуючого кола. Коліматор із паралельних пластин обмежує осьове розсіювання пучка, що дозволяє частково контролювати форму профілю дифракційного піка.

Дифрактометр також може працювати і в режимі пропускання. Перевага цього методу полягає в тому, щоб зменшити орієнтаційні ефекти в зразку. Для невеликих кількостей зразка застосовуються капіляри діаметром 0.5-2 мм.

**Рентгенівське випромінювання.** У лабораторії рентгенівське випромінювання отримують при бомбардуванні металевого анода електронами, які випромінюються за рахунок термоіонного ефекту і прискорюються сильним електричним полем (використовують високовольтний генератор). Значна частина кінетичної енергії електронів перетворюється на тепло, яке обмежує потужність рентгенів-

ської трубки і вимагає ефективного охолодження анода. 20-30-кратне збільшення яскравості пучка може бути отримане при застосуванні анода, що обертається, або спеціальної рентгенівської оптики. Як альтернатива рентгенівські фотони можуть бути згенеровані за допомогою величезних спеціальних пристроїв (синхротрон).

Спектр випромінювання рентгенівської трубки, що працює при високій електричній напрузі, складається із безперервного фонового поліхроматичного випромінювання і додаткового характеристичного випромінювання, яке залежить від типу анода. Тільки це характеристичне випромінювання застосовується в експериментах з рентгенівської дифракції. Джерела рентгенівського випромінювання, що застосовуються для рентгенівської дифракції, є вакуумними трубками з анодами, виготовленими з міді, молібдену, заліза, кобальту або хрому. Мідне, молібденове або кобальтове рентгенівське випромінювання застосовується для дослідження органічних речовин (причому використання кобальтового анода особливо доцільне для чіткого розділення піків). Вибір необхідного випромінювання передусім залежить від характеристики поглинання зразка і можливої флюоресценції атомів зразка. Довжини хвиль, які звичайно застосовують для дифракції

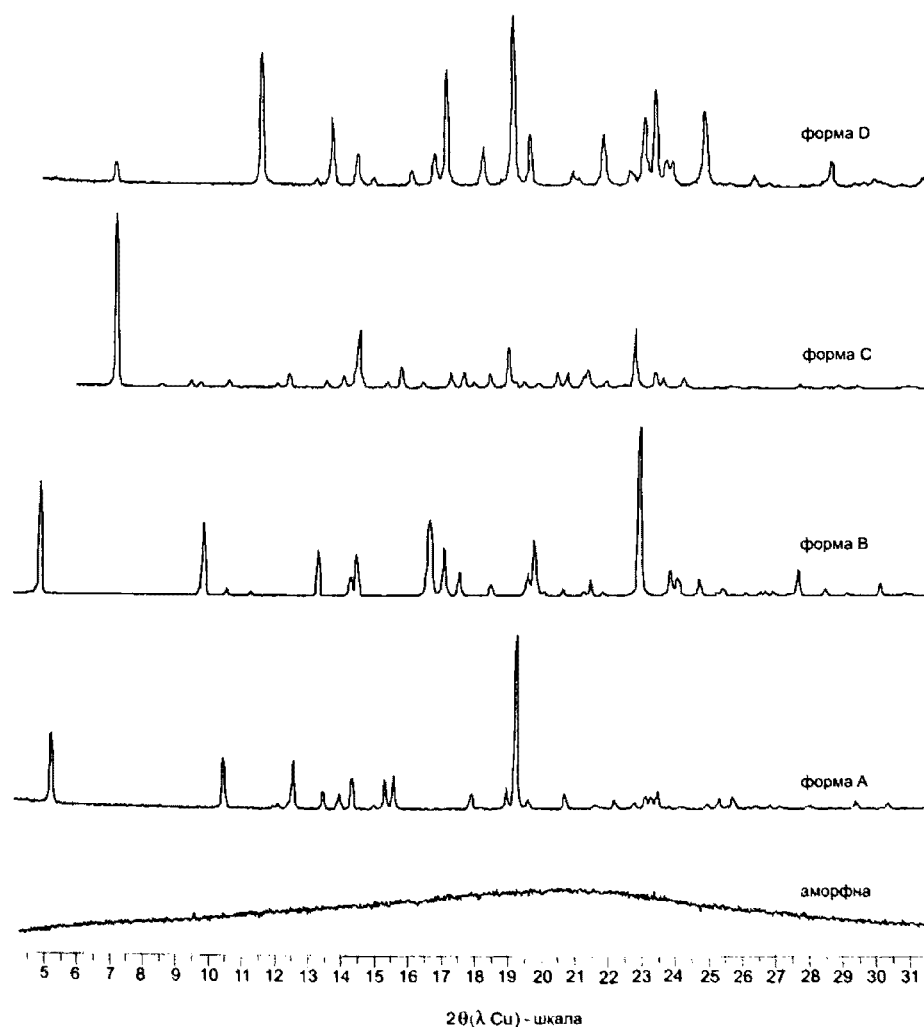
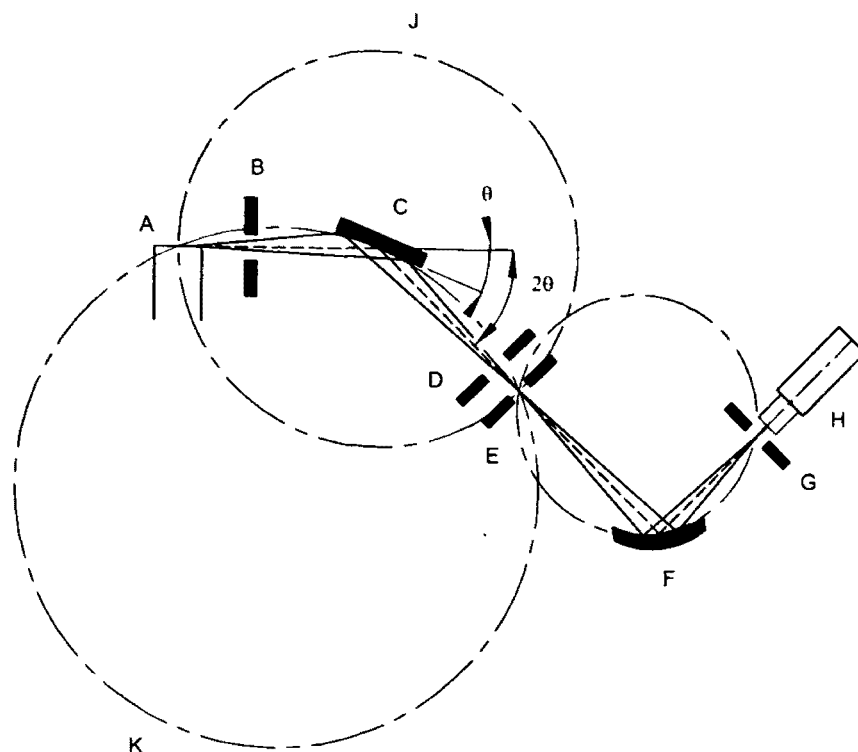


Рисунок 2.9.33.-2. Рентгенівські дифрактограми п'яти різних твердих фаз субстанції (інтенсивності нормалізовані)



А. Рентгенівська трубка  
В. Щілина розбіжності  
С. Зразок

Д. Щілина протидифузійна  
Е. Приймальна щілина  
Ф. Монохроматор

Г. Детектор приймальної щілини  
Н. Детектор  
І. Кол дифрактометра  
К. Фокусуючий кол

Рисунок 2.9.33.-3. Геометрична парафокусуєча конфігурація Брегга-Брентано

порошку, відповідають  $K_{\alpha}$  випромінюванню анода. Отже, доцільно провести «монохроматизацію» рентгенівського пучка, відсікаючи інші компоненти рентгенівського спектра. Це частково може бути зроблено за допомогою  $K_{\alpha}$  фільтрів, які є металевією фольгою, що складається з металу, край поглинання якого знаходиться між  $K_{\alpha}$  і  $K_{\beta}$  довжинами хвиль емісійного спектра трубки.

Такі фільтри звичайно поміщають між рентгенівською трубкою і зразком. Другий все частіше використовуваний спосіб отримання монохроматичного рентгенівського пучка — це використання великого кристала-монохроматора (звичайно називають просто «монохроматор»). Цей кристал поміщають перед або після зразка, що призводить до дифракції рентгенівського пучка (тобто  $K_{\alpha}$  і  $K_{\beta}$ ) під різними кутами, при цьому тільки один з них реєструється детектором. Більш того, існує можливість розділення  $K_{\alpha 1}$  і  $K_{\alpha 2}$  випромінювань за допомогою спеціалізованих монохроматорів. На жаль, виграш в отриманні монохроматичного випромінювання за допомогою бета-фільтра або монохроматора супроводжується істотною втратою його інтенсивності. Інший метод розділення  $K_{\alpha}$  і  $K_{\beta}$  довжин хвиль полягає у використанні зігнутих рентгенівських дзеркал, які одночасно монохроматизують і фокусують (або паралелізують) рентгенівський пучок.

**ЗАХИСТ ВІД ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ.** Опромінення будь-якої частини тіла рентгенівськими променями може завдати шкоди здоров'ю.

*Тому при проведенні експериментів із рентгенівським випромінюванням необхідно вжити адекватних заходів для захисту оператора або присутніх поруч людей. Для оцінки можливої шкоди, яка може бути завдана рентгенівським випромінюванням, застосовують розрахунок контрольних рівнів згідно з чинним законодавством країни. Якщо немає офіційних правил або рекомендацій регуляторних органів у країні, використовують рекомендації Міжнародної комісії з радіологічного захисту.*

## ПІДГОТУВАННЯ ЗРАЗКА ТА ЙОГО ВСТАНОВЛЕННЯ

Підготування порошкоподібних матеріалів і встановлення зразка у підходящий тримач — це критичні етапи різних аналітичних методик, що також важливо в РДП аналізі, оскільки це сильно впливає на якість одержаних даних<sup>(3)</sup>. Основні причини помилок, пов'язаних із пробопідготовкою, стисло тут наведені для приладів із парафокусуєчою конфігурацією Брегга-Брентано.

## ПРОБОПІДГОТОВКА

Звичайно морфологія багатьох кристалічних частинок має тенденцію при приготуванні зразка давати певний ступінь переважної орієнтації кристалітів

(3) Так само зміни в зразку можуть відбуватися під час збору даних у разі нерівноважного зразка (температура, вологість).

## 2.9. Фармако-технологічні випробування

у тримачі. Це особливо важливо для голчастих і пластинчастих кристалів, подрібнення яких призводить до утворення голочок і пластинок меншого розміру. Переважна орієнтація в зразку впливає на інтенсивності різних рефлексів, при цьому деякі рефлекси стають інтенсивнішими, а деякі – менш інтенсивними в порівнянні з дифрактограмою цього самого зразка за відсутності переважної орієнтації. Для зменшення переважної орієнтації застосовують низку методів, серед яких найбільш загальним і найпростішим є метод максимального подрібнення зразка. Оптимальна кількість кристалітів залежить від геометрії дифрактометра, необхідного розділення і ослаблення рентгенівського пучка зразком. У багатьох випадках розмір частинок 50 мкм дає задовільні результати для ідентифікації фаз. Проте надмірне подрібнення (розмір кристалітів менше як 0.5 мкм) може призвести до розширення ліній й інших значних змін у зразку, серед них:

- забруднення зразка частинками зі здрібнюючого інструмента (ступка, товкач, кулі та ін.);
- зменшення ступеня кристалічності;
- твердофазний фазовий перехід в іншу кристалічну модифікацію;
- хімічний розпад;
- внесення внутрішньої напруги;
- твердофазна реакція.

Тому бажано порівняти дифрактограму неподрібненого зразка з дифрактограмою зразка, який містить дрібніші частинки (подрібнений зразок). Якщо при цьому одержана дифрактограма має прийнятну якість, рекомендується використання зразка без попереднього подрібнення.

Необхідно відзначити, що, якщо вихідної зразок містить декілька кристалічних фаз і для виділення фракції з певним розміром частинок зразок просіюють, може відбутися зміна складу.

### ВСТАНОВЛЕННЯ ЗРАЗКА

**Ефект зсуву зразка.** Зсув поверхні зразка на величину  $D$  щодо осі обертання гоніометра призводить до систематичної помилки, позбутися якої повністю дуже важко. У режимі відбиття такий зсув призводить до зсуву положення піка ( $2\theta$ ) на величину  $D_{\cos\theta}$ <sup>(4)</sup>. Наприклад, при зсуві поверхні зразка  $D = 15$  мкм зсув дифракційного піка складає близько  $0.01^\circ$  при низьких  $2\theta$ -кутах (оскільки  $\cos\theta \approx 1$ ) і спостерігається асиметричне розширення профілю у напрямі пониження  $2\theta$ -кута. Використання підходящого внутрішнього стандарту дозволяє визначити і корегувати ефект зсуву зразка, одночасно виключаючи ефект його прозорості. Це, безумовно, найбільше джерело помилок при зборі даних на добре від'юстованих дифрактометрах.

**Ефект прозорості та товщини зразка.** При застосуванні РДП методу в режимі відбиття краще працювати в

(4) Зсув нуля гоніометра призведе до однакового зсуву всіх спостережуваних  $2\theta$ -положень дифракційних ліній. Іншими словами, вся дифрактограма зміщується на офсет  $z^\circ$  у  $2\theta$ .

умовах зразка з «нескінченною товщиною». Щоб зменшити ефект прозорості, рекомендується використовувати невідбиваючу підкладку (тримач із нульовим фоном), наприклад пластину монокристалічного кремнію, вирізану паралельно площині 510<sup>(5)</sup>. Ефектами, пов'язаними з висотою зразка і його прозорістю, можна нехтувати при роботі в режимі пропускання. Використання підходящого внутрішнього стандарту дозволяє визначити і внести корекцію в даний тип ефектів, одночасно виключаючи ефект зсуву зразка.

### КОНТРОЛЬ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИЛАДУ

Гоніометр і, відповідно, оптики падаючого і дифрагованого пучка складаються із безлічі механічних частин, які мають бути від'юстовані. Ступінь юстування або роз'юстування безпосередньо впливає на якість результатів дослідження за допомогою РДП. Тому різні компоненти дифрактометричної системи мають бути добре від'юстованими (оптична і механічна частини та ін.), щоб адекватно зменшити кількість систематичних помилок, оптимізуючи отримані детектором інтенсивності. Головним протиріччям при юстуванні дифрактометра є пошук максимального розділення і максимальної чутливості. Тому найкращий компроміс між розділенням і чутливістю досягається під час юстування. Для різних конфігурацій приладу і приладів різних виробників існують специфічні процедури юстування.

Усі робочі характеристики дифрактометра мають періодично перевірятися з використанням підходящих сертифікованих стандартних зразків. Залежно від типу аналізу можуть використовуватися інші добре описані стандартні зразки, однак перевагу слід надавати сертифікованим стандартним зразкам.

### ЯКІСНИЙ ФАЗОВИЙ АНАЛІЗ (ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФАЗ)

Ідентифікація фазового складу невідомих зразків за допомогою РДП заснована на візуальному або комп'ютерному порівнянні експериментальної дифрактограми або її частини з експериментальною або розрахованою дифрактограмою стандартних зразків. В ідеалі, ці стандартні дифрактограми записують для добре охарактеризованих монофазних зразків. Такий підхід дозволяє в більшості випадків ідентифікувати кристалічну субстанцію за значеннями  $2\theta$ -дифракційних кутів або за  $d$ -відстанями і за їх відносними інтенсивностями. Порівняння дифрактограм невідомих зразків з наявними за допомогою

(5) У разі тонкого зразка з низьким поглинанням точні вимірювання положень ліній можуть бути проведені у фокусуєчій конфігурації дифрактометра як в геометрії пропускання, так і відбиття. Точні вимірювання положень ліній зразка з низьким поглинанням доцільно проводити, використовуючи дифрактометри з оптикою паралельного пучка. Це допомагає зменшити ефекти тонкості зразка.

комп'ютера може ґрунтуватися або на до певної міри розширеному діапазоні  $2\theta$  всієї дифрактограми, або на наборі раніше оброблених даних, отриманих із дифрактограми. Наприклад, таблиця  $d$ -відстаней і відповідних їм нормалізованих інтенсивностей ( $I_{\text{норм}}$ ), також звана таблицею  $(d, I_{\text{норм}})$ , отримана з дифрактограм, є кристалографічними «відбитками пальців» речовини і може бути порівняна з таблицями  $(d, I_{\text{норм}})$  монофазних зразків, скомпільованих у базі даних.

Для більшості органічних кристалів при використанні випромінювання  $\text{Cu K}_\alpha$  доцільно записувати дифрактограму в діапазоні  $2\theta$  від величин, близьких до  $0^\circ$  і як мінімум до  $40^\circ$ . Відповідність  $2\theta$ -дифракційних кутів випробовуваного і стандартного зразків звичайно знаходиться у межах  $0.2^\circ$  для тієї самої кристалічної форми, тоді як відносні інтенсивності випробовуваного і стандартного зразків можуть варіювати через внесок ефектів переважної орієнтації. За своєю природою різні гідрати та сольвати можуть мати змінні параметри елементарної комірки, що спостерігатиметься у вигляді зсуву положення дифракційних піків на експериментальній дифрактограмі цих речовин. Для цього класу сполук зміна  $2\theta$ -положення піків може бути і більше  $0.2^\circ$ . Тому критерій зсуву піків на  $0.2^\circ$  не обов'язковий для цих матеріалів. Для інших типів зразків (наприклад, неорганічних солей) може бути необхідно розширити діапазон  $2\theta$ -сканування далеко за  $40^\circ$ . Звичайно досить отримати 10 найбільш сильних рефлексів, ідентифікованих у базах РДП даних монофазних зразків.

Іноді дуже важко або навіть неможливо ідентифікувати фази у наведених нижче випадках:

- субстанції не кристалізовані або аморфні;
- масова частка компонентів, що ідентифікуються, в зразку низька (звичайно менше 10 % м/м);
- значні ефекти переважної орієнтації;
- фаза відсутня у базі даних;
- утворення твердих розчинів;
- присутність сильно розупорядкованих структур, що спотворює елементарну комірку;
- зразок містить занадто багато фаз;
- наявність деформацій ґрат;
- структурна схожість різних фаз.

## КІЛЬКІСНИЙ ФАЗОВИЙ АНАЛІЗ

Якщо випробовуваним зразком є суміш двох або більше відомих фаз, із яких не більш як одна — аморфна, у багатьох випадках можна визначити відсотковий вміст кожної кристалічної і аморфної фази (за об'ємом або за масою). Кількісний фазовий аналіз може ґрунтуватися на інтегральних інтенсивностях, висоті піків декількох індивідуальних дифракційних ліній<sup>(6)</sup> або на всій дифрактограмі.

(6) Якщо кристалічні структури усіх компонентів суміші відомі, то точний кількісний склад може бути розрахований за допомогою методу Рітвельда. Якщо не відомі кристалічні структури компонентів, можна застосовувати методи Поулі або найменших квадратів.

Ці інтегральні інтенсивності, висоту піків або всю дифрактограму порівнюють з відповідними величинами стандартних зразків. Ці стандартні зразки мають бути монофазними або сумішшю відомих фаз. Труднощі, супутні кількісному аналізу, пов'язані, в основному, з пробопідготовкою (точність і відтворюваність результатів вимагають гомогенності всіх фаз, рівномірності розмірів частинок і їх розподілу для кожної фази) і з матричними ефектами. У сприятливих випадках у твердих матрицях до 10 % кількості кристалічної фази можна визначити.

## ПОЛІМОРФНІ ЗРАЗКИ

Для зразків, що складаються із двох поліморфних фаз  $a$  і  $b$ , для визначення фракції  $F_a$  фази  $a$  може бути використане таке рівняння:

$$F_a = \frac{1}{1 + K(I_b / I_a)}$$

Фракція розраховується зі співвідношення інтенсивностей двох фаз і константи  $K$ . Константа  $K$  — це співвідношення абсолютних інтенсивностей двох чистих поліморфних фаз  $I_{0a}/I_{0b}$  і може бути визначена за допомогою вимірювань стандартних зразків.

## МЕТОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ СТАНДАРТНИХ ЗРАЗКІВ

Для кількісного фазового аналізу найчастіше використовуються такі методи:

- «метод зовнішнього стандарту»;
- «метод внутрішнього стандарту»;
- «метод стандартних добавок».

«Метод зовнішнього стандарту» — це найбільш загальний метод, який полягає в порівнянні дифрактограм суміші або інтенсивностей відповідних піків із дифрактограмами стандартної суміші або з теоретичними інтенсивностями структурної моделі, якщо вона повністю відома.

Для зменшення впливу помилок, пов'язаних з матричними ефектами, застосовують внутрішні стандартні зразки, розмір кристалітів і коефіцієнт абсорбції яких близький до компонентів випробовуваного зразка, а дифракційні лінії ніде не перекривають дифракційні лінії зразка. Певну кількість цього внутрішнього стандарту додають до випробовуваного зразка і до кожної зі стандартних сумішей. За цих умов спостерігається лінійна залежність між інтенсивностями ліній і концентраціями фаз. Такий захід називається «методом внутрішнього стандарту» і вимагає точного вимірювання інтенсивностей дифракційних піків.

У «методі стандартних добавок» деяку кількість чистої фази  $a$  додають у суміш, що містить невідому кількість фази  $a$ . Багатократні добавки дозволяють

## 2.9. Фармако-технологічні випробування

побудувати залежність інтенсивності від концентрації, при якій негативний відрізок координатної осі  $x$ , що відсікається графіком, відповідає невідомій концентрації компонента  $a$  у вихідному зразку.

### ОЦІНКА СПІВВІДНОШЕННЯ АМОРФНОЇ І КРИСТАЛІЧНОЇ ФАЗ

У сумішах, що містять кристалічну й аморфну фази, ці фракції можуть бути оцінені декількома методами. Вибір методу дослідження залежить від природи зразка.

- Якщо зразок складається із кристалічної й аморфної фаз, що належать до різних хімічних сполук, кількість кожної кристалічної фази може бути встановлена за допомогою стандартних зразків і методів, наведених вище. Аморфна складова при цьому обчислюється непрямим методом за різницею суми кристалічних компонентів.
- Якщо зразок складається із однієї аморфної й однієї кристалічної фази з тим самим елементним складом, то кількість кристалічної фази («ступінь кристалічності») установлюють, вимірюючи три площі дифрактограми:
  - $A$  — загальна площа дифракційних піків, отриманих від кристалічної складової зразка;
  - $B$  — загальна площа нижче площі  $A$ ;
  - $C$  — площа фону (фон від розсіювання повітрям, флуоресценції, устаткування та ін.).

Коли ці площі виміряні, ступінь кристалічності розраховують за формулою:

$$\% \text{ кристалічності} = 100A / (A + B - C)$$

Необхідно відзначити, що цей метод не дає абсолютних величин ступеня кристалічності, тому звичайно застосовується для порівняння.

Для визначення кристалічності також можна застосовувати складніші методи, такий як метод Руланда.

### СТРУКТУРА МОНОКРИСТАЛІВ

Звичайно визначення кристалічної структури проводять із дифракційних даних, одержаних із монокристала. Однак аналіз кристалічної структури органічних сполук досить важке завдання, оскільки параметри елементарної комірки порівняно великі, а симетрія низька. Крім цього, дифракція на органічних кристалах досить слабка.

Для будь-якої кристалічної форми субстанції знання структури дозволяє розрахувати відповідну дифрактограму РДП, забезпечуючи стандартною дифрактограмою, «вільною від переважних орієнтаційних ефектів», яка може бути використана для фазової ідентифікації.

### 2.9.41. КРИХКІСТЬ ГРАНУЛ І СФЕРОЇДІВ

У цій статті наведені два методи визначення крихкості гранул і сфероїдів, які можуть використовуватися при дослідженнях у ході фармацевтичної розробки. Однак допускається застосування інших методів із аналогічною придатністю.

Випробування призначене для встановлення крихкості сфероїдів і гранул у заданих умовах. Крихкість визначається як зменшення маси гранул або сфероїдів або утворення фрагментів гранул або сфероїдів при їх механічній обробці (обертанні, вібрації, розрідженні і т.д.). Прикладами змін є стирання, розлом або деформація гранул або сфероїдів.

#### МЕТОД А

**Обладнання (прилад зі зрідженням шаром).** Прилад (Рис. 2.9.41.-1) складається зі скляного циліндра ( $A$ ) з конічною нижньою частиною. Циліндр забезпечений сітчастою кришкою ( $B$ ) з розміром отворів 500 мкм або будь-якою іншою відповідною сіткою. Конічний кінець сполучений з U-подібною скляною трубкою ( $C$ ), яку можна від'єднати від циліндра для видалення гранул або сфероїдів. U-подібна трубка приєднана до T-подібної муфти ( $D$ ). Один вхід T-подібної муфти приєднаний силіконовою трубкою до манометра для регулювання потоку стиснутого повітря (використовують стиснуте повітря, що витримує вимоги з випробування «Вода», наведеного в статті «Повітря медичне»), інший кінець приєднаний через силіконову трубку до парціального витратоміра ( $E$ ) (0.10-1.00 м<sup>3</sup>год<sup>-1</sup>).

**Методика.** Звичайно використовують таку процедуру. Дрібні частинки видаляють просіюванням (використовують сито з розміром отворів 710 мкм або будь-яке інше підхоже сито). У циліндр ( $A$ ) поміщають близько 8.0 г гранул або сфероїдів ( $m_1$ ), прилад закривають сітчастою кришкою ( $B$ ). Регулюють швидкість потоку стиснутого повітря на рівні 0.45 м<sup>3</sup>год<sup>-1</sup>. Через 15 хв із приладу, від'єднавши U-подібну трубку, видаляють гранули або сфероїди і знову зважують ( $m_2$ ). Випробовують 3 зразка та розраховують середнє значення. Внутрішню поверхню приладу після кожного третього випробування рекомендується обприскувати антистатиком для запобігання електростатичного заряджання.

**Втрата в масі при висушуванні.** Якщо немає інших зазначень, зразки висушують у сушильній шафі при температурі 105 °С. Можуть бути використані інші умови висушування, наведені в статті (2.2.32).

#### Розрахунки

$$F = \frac{m_1(100 - T_1) - m_2(100 - T_2)}{m_1} \times 100,$$

де:

$F$  — крихкість гранул або сфероїдів;

## 2.9. Фармако-технологічні випробування

- $T_1$  — втрата в масі при висушуванні до випробування, у відсотках (середнє значення двох визначень);
- $T_2$  — втрата в масі при висушуванні після випробування, у відсотках (середнє значення двох визначень);
- $m_1$  — маса гранул або сфероїдів до випробування, в грамах;
- $m_2$  — маса гранул або сфероїдів після випробування, в грамах.

### МЕТОД В

**Обладнання (прилад з осцилятором).** Прилад (Рис. 2.9.41.-2) складається зі скляного контейнера місткістю 105 мл, що містить випробовувані гранули або сфероїди, які піддаються горизонтальній осциляції. Частота та тривалість осциляції може постійно мінятися. Частота може регулюватися в межах від 0 до 400 осциляцій/хв. Тривалість може бути встановлена в межах від 0 до 9999 с.

**Методика.** Звичайно використовують таку процедуру. Дрібні частинки видаляють просіюванням (використовують сито з розміром отворів 355 мкм або

будь-яке інше підхоже сито). У скляному контейнері зважують близько 10.00 г ( $m_1$ ) гранул або сфероїдів. Контейнер поміщають у прилад. Струшують протягом 240 с при найбільшій частоті для твердих гранул або сфероїдів або протягом 120 с при малій частоті (тобто 140 осциляцій/хв для м'яких гранул або сфероїдів). Просіюють (355 мкм або те саме сито, що і на початку випробування) і знову зважують ( $m_2$ ). Випробовують 3 зразка та розраховують середнє значення.

**Втрата в масі при висушуванні.** Якщо немає інших зазначень, зразки висушують у сушильній шафі при температурі 105 °С. Можуть бути використані інші умови висушування, наведені в статті (2.2.32).

### Розрахунки

$$F = \frac{m_1(100 - T_1) - m_2(100 - T_2)}{m_1} \times 100,$$

де:

- $F$  — крихкість гранул або сфероїдів;
- $T_1$  — втрата в масі при висушуванні до випробування, у відсотках (середнє значення двох визначень);

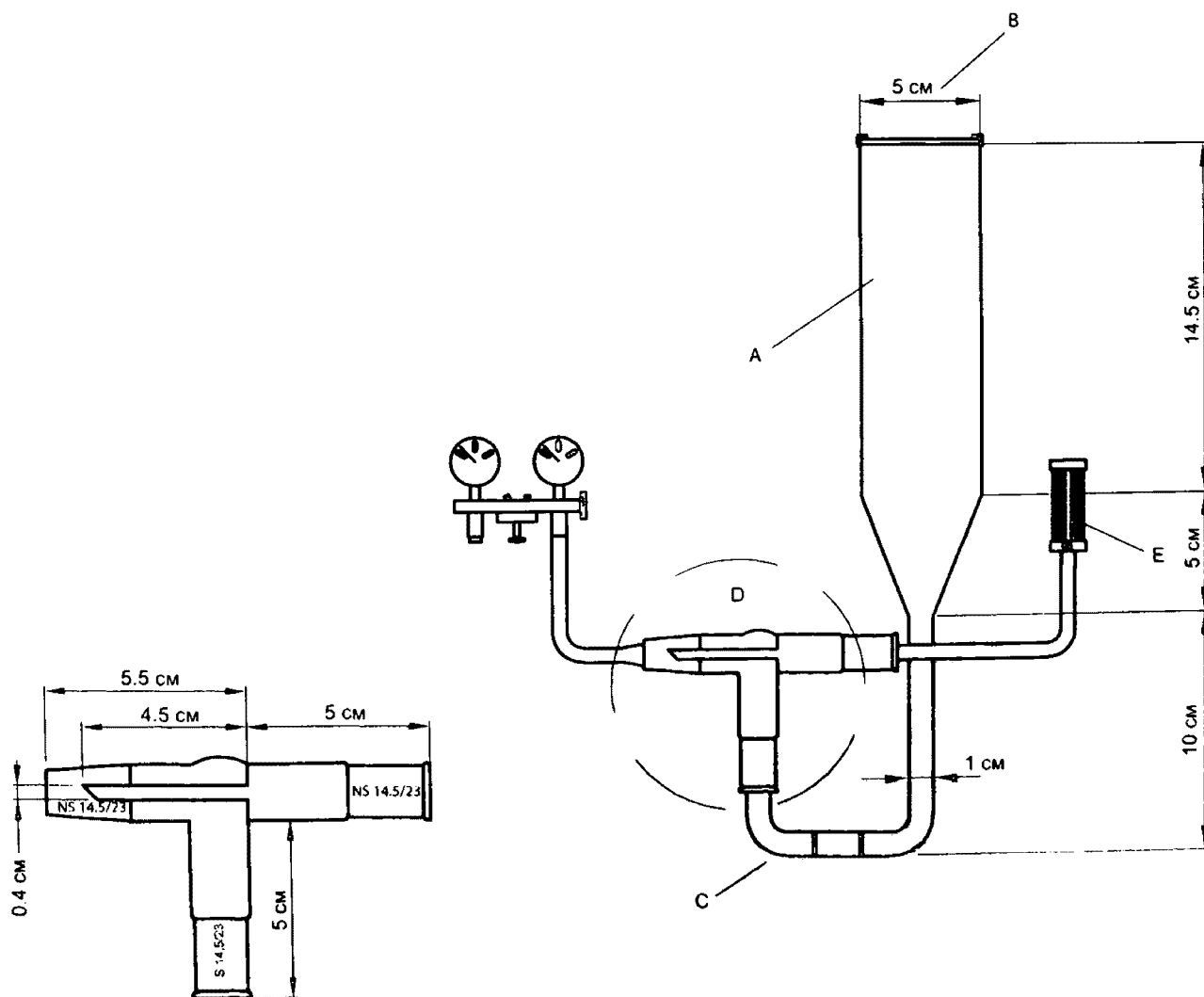


Рисунок 2.9.41.-1. Прилад із зрідженим шаром

## 2.9. Фармако-технологічні випробування

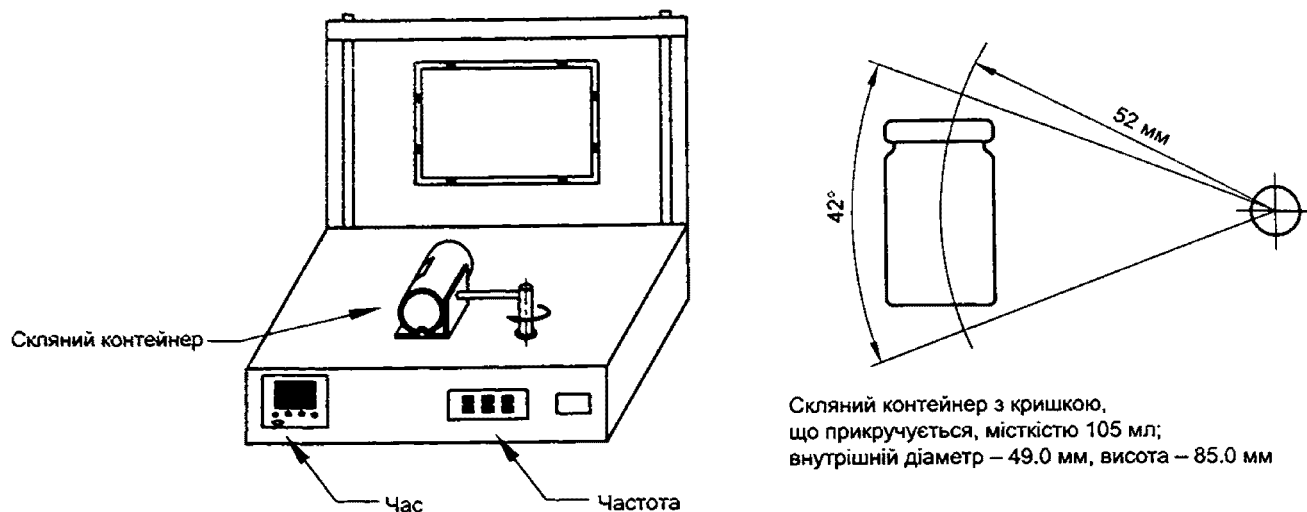


Рисунок 2.9.41.-2. Прилад з осцилятором

- $T_2$  — втрата в масі при висушуванні після випробування, у відсотках (середнє значення двох визначень);
- $m_1$  — маса гранул або сфероїдів до випробування, в грамах;
- $m_2$  — маса гранул або сфероїдів після випробування, в грамах.

### 2.9.45. ЗМОЧУВАНІСТЬ ПОРИСТИХ ТВЕРДИХ РЕЧОВИН І ПОРОШКІВ

#### ВСТУП

Змочуваність твердих поверхонь звичайно характеризується прямим або непрямим вимірюванням кута зіткнення. Кут зіткнення ( $\theta$ ) рідини з твердою речовиною — це кут, який утворюється при дотику краплі рідини з твердою поверхнею. Це зображено на Рис. 2.9.45.-1. Для даної рідини змочувані тверді речовини мають малий кут зіткнення, а незмочувані тверді речовини утворюють кут  $90^\circ$  або більше.

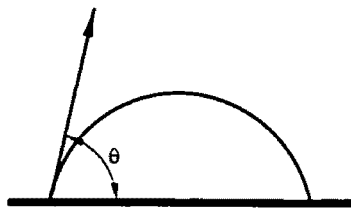


Рисунок 2.9.45.-1. Спостережуваний кут зіткнення ( $\theta$ ) нерухомої краплі з непористою поверхнею

Нижче наведені 2 методи визначення змочуваності. Методи дозволяють вимірювати змочуваність таких пористих твердих речовин, як порошки та гранули. Обидва методи виражають змочуваність вимірюванням кута зіткнення певної рідини з пористою твердою речовиною.

Метод нерухомої краплі заснований на прямому вимірюванні кута зіткнення нерухомої краплі з диском пресованого порошку.

Методом Вашбурна кут зіткнення вимірюють не прямо. Метод заснований на капілярному ефекті пор порошку. Ефект (масове посилення) реєструється спеціальними електронними вагами, починаючи з моменту зіткнення зразка порошку з поверхнею рідини, переважно такої, що не розчиняє або мало розчиняє зразок. Вимірювання чинить мінімальну дію або взагалі не діє на стан порошку.

Випробовувані зразки не рекомендується піддавати будь-якій попередній обробці, оскільки це може значно змінити властивості речовини. Наприклад, пресування порошку у вигляді диска може зменшити вільну поверхневу енергію при зміні кристалічного стану порошку (наприклад, метастабільні форми) або може збільшити вільну поверхневу енергію утворенням дефектів кристалів (недолік методу нерухомої краплі, оскільки при випробуванні проводять пресування порошку в диск).

Методи звичайно застосовують для дослідження таких параметрів:

- відтворюваність зразка в плані змочуваності від партії до партії;
- ефект в'язкості рідини на змочуваність;
- ефект поверхневого натягу рідини на змочуваність;
- зміни поверхневих властивостей зразків.

#### МЕТОД НЕРУХОМОЇ КРАПЛІ

Цей метод може використовуватися для прямого визначення змочуваності покриттів і пресованих дозованих лікарських форм, таких як таблетки. Більш того, іноді можливо це використовувати в динамічних вимірюваннях (вимірювання динамічного кута зіткнення нерухомої краплі, Рис. 2.9.45.-2) пористої твердої речовини з рідиною при зменшенні кута зіткнення. Вимірюючи декілька значень кута як функцію в часі, можна вивчити швидкість поширення і супутнє проникнення краплі рідини в злегка пористу тверду речовину.

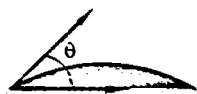
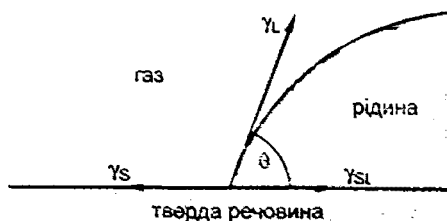


Рисунок 2.9.45.-2. Визначення нерухомої краплі візуальним оглядом краплі

В умовах рівноваги кут зіткнення нерухомої краплі залежить від трьох взаємопов'язаних поверхневих натягів і визначається з використанням рівняння Янга (див. Рис. 2.9.45.-2, перша частина):

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta,$$

де:

$\gamma_S$  — поверхневий натяг на межі твердої речовини з повітрям;

$\gamma_{SL}$  — міжфазовий натяг твердої речовини з рідиною;

$\gamma_L$  — поверхневий натяг на межі рідини з повітрям.

## МЕТОДИКА

Оскільки порошки не здатні утворювати абсолютно плоску поверхню, порошок звичайно пресують у вигляді диска для того, щоб зробити поверхню гладшою. Краплю рідини певного об'єму поміщають на диск (див. Рис. 2.9.45.-2) і безпосередньо вимірюють кут зіткнення, використовуючи гоніометр, забезпечений окулярним кутоміром, або геометричною побудовою на фотомікрографі. Можуть бути використані інші фізичні і математичні методи аналізу результатів. Об'єм краплі може впливати на результат. Проводять декілька вимірювань кута зіткнення ( $\theta$ ) ( $n=6$ ) і розраховують середнє значення.

## МЕТОД ВАШБУРНА

Метод Вашбурна дозволяє вимірювати кут зіткнення пористих твердих речовин у діапазоні від 0 до 90°.

Випробовуваний матеріал — це поєднання зразка, тримача і системи фільтрів. Отже, підрахунок або визначення дійсного значення не можливі та можна визначити лише спостережувані значення кута зіткнення. Однак кут зіткнення зразка — функціональна властивість, від якої значно залежить результат. Підсумком випробування є складання впорядкованого переліку змочуваності різних субстанцій або готових лікарських засобів за їх спостережуваним кутом зіткнення.

## ПРИНЦИП

Якщо пориста тверда речовина торкається рідини, але не занурюється в неї, а рідина лише стикається із поверхнею, то попадання рідини в пори твердої речовини внаслідок капілярних сил визначають такими рівняннями:

$$m^2 = \frac{t}{A}, \quad (1)$$

де:

$m$  — маса рідини, яку увібрала тверда речовина;

$t$  — час контакту твердої речовини з рідиною;

$A$  — константа, залежна від властивостей рідини і випробовуваної речовини, розрахована з використанням наведеної формули:

$$A = \frac{\eta}{c \times \rho^2 \times \gamma \times \cos \theta}, \quad (2)$$

де:

$\eta$  — в'язкість рідини;

$\rho$  — густина рідини;

$\gamma$  — поверхневий натяг рідини;

$\theta$  — кут зіткнення рідини з твердою речовиною;

$c$  — константа речовини, залежна від пористої структури твердої речовини.

З рівнянь (1) і (2) отримуємо (3):

$$\cos \theta = \frac{m^2}{t} \times \frac{\eta}{c \times \rho^2 \times \gamma}, \quad (3)$$

При визначенні методом Вашбурна використовується рідина з відомою густиною ( $\rho$ ), в'язкістю ( $\eta$ ) і поверхневим натягом ( $\gamma$ ). У цих умовах, коли маса рідини розтікається по порах твердої речовини, вимірюється як функція в часі (оскільки швидкість капілярного проникнення ( $m^2/t$ ) є експериментальним даним), у рівнянні (3) залишаються 2 невідомих — кут зіткнення ( $\theta$ ) з твердою речовиною і константа твердої речовини ( $c$ ).

**Визначення константи матеріалу ( $c$ ).** Константу матеріалу для пористих твердих речовин визначають за наведеною нижче формулою, вважаючи пори циліндричними:

$$\frac{\pi^3 \times r^5 \times N^2}{2}, \quad (4)$$

де:

$r$  — середній радіус капіляра в порах твердої речовини;

$N$  — кількість капілярів на одиницю об'єму.

Якщо визначення методом Вашбурна проводять з рідиною, кут зіткнення якої з твердою речовиною вважається таким, що дорівнює 0° ( $\cos 0^\circ = 1$ ), тоді константа твердої речовини залишається єдиним невідомим у рівнянні (3) і має бути визначена. Рекомендується для визначення константи матеріалу використовувати  $n$ -гептан через його низький поверхневий натяг (20.14 мН·м<sup>-1</sup> при 25 °С). Також



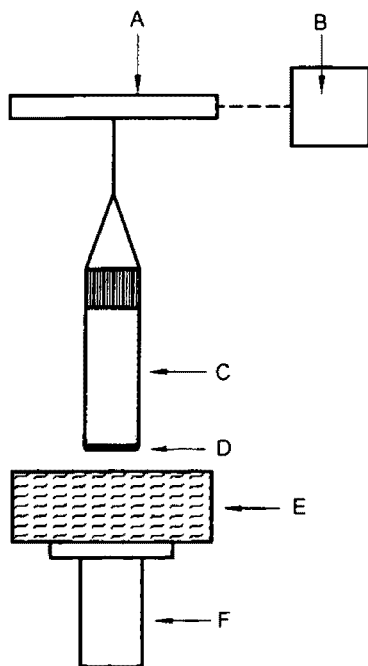
## 2.9. Фармако-технологічні випробування

можна використовувати *n*-гексан ( $18.43 \text{ мН} \cdot \text{м}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$ ), але він більш леткий. Якщо порошок розчиняється дуже швидко в цих речовинах, можна використовувати гексаметилдисилоксан ( $15.9 \text{ мН} \cdot \text{м}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$ ). Проводять паралельні визначення ( $n=6$ ) і розраховують середнє значення.

Після визначення константи (*c*) для випробовуваної твердої речовини можна визначити її змочуваність іншою рідиною. Константа матеріалу, визначена випробуванням з *n*-гептаном, використовується у рівнянні Вашбурна разом із даними щодо швидкості капілярного проникнення ( $m^2/t$ ) при випробуванні речовини із зазначеною рідиною. Це дозволяє розрахувати кут зіткнення.

**ПРИМІТКА:** якщо для даної твердої речовини проводять випробування з рядом рідин (не менше 2 рідин разом із рідиною, використаною для визначення константи матеріалу), отримані результати щодо кута зіткнення можуть використовуватися для розрахунку поверхневої енергії пористої твердої речовини.

### ОБЛАДНАННЯ



- А. Електронні ваги
- В. Комп'ютер
- С. Тримач зразка
- Д. Фільтр
- Е. Рідина занурення
- Ф. Підйомник

Рисунок 2.9.45.-3. Прилад для вимірювання кута зіткнення методом Вашбурна

На Рис. 2.9.45.-3 наведені основні складові частини приладу. Головний пристрій — це електронні ваги з підходящим процесором, які забезпечують відповідне розділення вимірювання витіснення і відповідне розділення підйому рідини занурення до зразка.

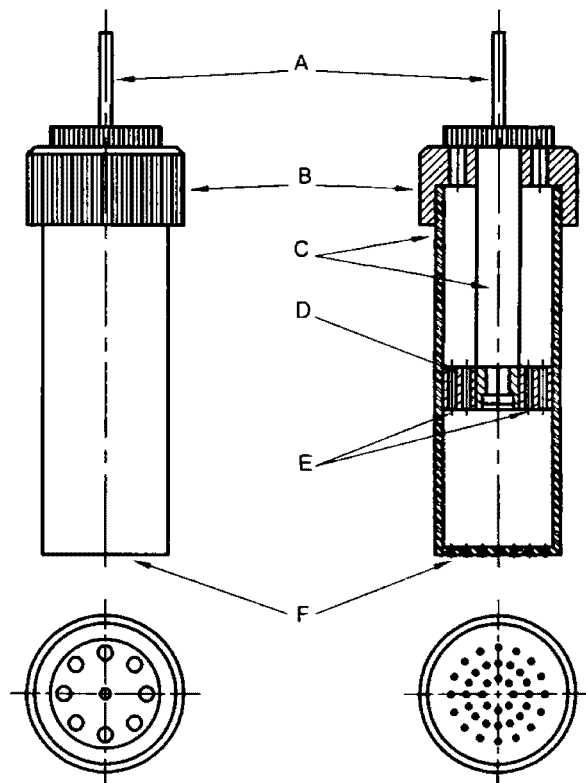
У Табл. 2.9.45.-1 наведені звичайно підхожі для електронних ваг параметри.

Таблиця 2.9.45.-1.  
Технічні параметри електронних вагів

	Підйом	Вимірювання маси
Діапазон	>110 мм	0-210 г
Розділення	0.1 мкг	10 мкг
Швидкість	0.099-500 мм/хв	—

**Тримачі зразків.** Як тримач зразка може служити маленький скляний циліндр із фільтром зі скловолокна на одному кінці.

Тримачі порошкового матеріалу також можуть бути з алюмінію (див. Рис. 2.9.45.-4); вони менш крихкі, ніж скляні, мають дрібні отвори на дні, і відповідно їх простіше чистити, ніж фільтр зі скловолокна. Кришка комірки має 2 гвинти з різьбою: один приєднує кришку до камери зразка, а другий дозволяє користувачеві спрямовувати поршень всередину зразка і пресувати. Прилад аналогічний автоматичному тензіометру, окрім тримача зразка.



Вид дна поршня

Вид дна приладу

- А. Фіксатор
- В. Кришка
- С. Горловина
- Д. Поршень
- Е, Ф. Капілярні отвори

Рисунок 2.9.45.-4. Приклад тримача зразка з поршнем для пресування порошку

### МЕТОДИКА

**Наповнення тримача зразка.** Диск із фільтрувального паперу поміщають на алюмінієвий або скляний тримач зразка. Це запобігає витіканню зразка з дна комірки. Не обов'язково використовувати паперовий фільтр, але він має бути з матеріалу, легко змочуваного у випробовуваній рідині. Рекомендується використовувати фільтр (чорна стрічка), що засто-

совується для зворотнього осмосу, через його високу пористість і мінімальний опір плинності.

Певну кількість порошку поміщають у комірку. Відтворюваність констант матеріалу і кута зіткнення залежатимуть від сталості наважки порошку для кожного випробування, коли достатня і визначена кількість порошку пресується однаково (тобто по-стуканням/пресуванням порошку).

Для більшості порошоків необхідна кількість знаходиться у діапазоні декількох грамів, що звичайно заповнює 2/3 ємності тримача. Другий паперовий фільтр поміщають зверху порошку в комірку, що запобігає втраті порошку крізь отвори поршня у процесі пресування і/або в ході визначення.

**Усадка/пресування порошку.** Насипаний шар порошку дуже пористий і чутливий до щонайменших дій, які можуть значно змінити пористість і згодом  $c$ -константу. Тому для отримання відтворюваних результатів краще використовувати порошок після усадки. Слід спочатку визначити відповідну кількість зіскоків: звичайно достатньо 50-100 зіскоків.

Якщо використовують алюмінієвий тримач зразка, то його можна встановити на циліндричний штампувальний волюметр, який може провести встановлену кількість зіскоків.

Якщо усадка не прийнятна, шар порошку пресують, укручуючи поршень алюмінієвого тримача зразка, докладаючи певний тиск.

Іншим можливим способом є центрифугування у певних умовах. Де застосовно, пресований диск зразка також може бути встановлений на електронні ваги. У цьому разі тримач порошку можна виключити.

Після приєднання до вагів тримач зразка з пористою твердою речовиною розташовують безпосередньо

над поверхнею рідини (див. Рис. 2.9.45.-3), використовуючи підйомник.

Рідину підіймають до моменту зіткнення з дном пористого зразка. Записують результати маси в часі в міру проникнення рідини в тверду речовину. Дані можуть бути подані у вигляді графіків або таблиць. Прилад може все визначення проводити в автоматичному режимі.

### КРИТИЧНІ ПАРАМЕТРИ

Слід врахувати таке:

*Властивості зразка:*

- вміст води в зразку;
- кристалічні властивості або твердий стан зразка (поліморфні форми, тип сольватації).

*Підготовка зразка:*

- гомогенність випробовуваної порошкової суміші;
- розподіл за розміром частинок: іноді рекомендується до проведення випробування просіювати порошок (наприклад, з використанням сита з розміром отворів 250 мкм);
- слід визначити оптимальні параметри пресування (кількість зразка, кількість зіскоків або масу поршня);
- має бути однаковим стан пресування різних зразків порошку;
- слід ретельно очистити тримач зразка або, якщо була використана, скляну глазур;
- однорідність результатів покращується при використанні алюмінієвого тримача зразка.

*Рідина занурення:*

- слід зазначити специфікації рідини занурення.



# **ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ**



## 5.1. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ З МІКРОБІОЛОГІЇ

### 5.1.3. ЕФЕКТИВНІСТЬ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ

Якщо готовий лікарський засіб сам по собі не має достатньої антимікробної активності, до його складу можуть бути уведені антимікробні консерванти, що особливо важливо для лікарських засобів у вигляді водних розчинів. Оскільки мікробне забруднення може викликати інфікування пацієнта або псування готового лікарського засобу, антимікробні консерванти призначені для запобігання розмноженню мікроорганізмів або обмеження мікробної забрудненості готового лікарського засобу в процесі зберігання і застосування, особливо у випадку використання багатодозових упаковок. Антимікробні консерванти не мають використовуватися як альтернатива належній виробничій практиці.

Ефективність антимікробного консерванта може посилюватися або послаблюватися в результаті взаємодії з діючою речовиною або іншими компонентами готового лікарського засобу, а також з пакувальними або закупорювальними матеріалами. Тому протягом терміну придатності треба контролювати антимікробну активність готового лікарського засобу, що зберігається у контейнері, з метою доказу того, що вона не знижується у процесі зберігання. Для такого контролю можуть бути використані зразки, добуті з контейнера безпосередньо перед випробуванням.

На стадії розробки лікарського засобу треба довести, що антимікробна активність самого лікарського засобу або при необхідності лікарського засобу з добавкою придатного консерванта(ів) забезпечує належний захист від небажаних ефектів, які можуть бути результатом мікробного забруднення лікарського засобу або розмноження в ньому мікроорганізмів у процесі зберігання і використання.

Випробування ефективності антимікробних консервантів може бути проведено, як описано нижче. Дане випробування не призначене для рутинного контролю.

#### ВИПРОБУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ

Для проведення випробування у готовий лікарський засіб, що знаходиться по можливості у контейнері, вносять зазначену нижче кількість придатних тест-мікроорганізмів і зберігають інокульовані зразки при зазначеній нижче температурі. Через певні проміжки часу з інокульованих зразків відбирають проби і визначають в них число мікроорганізмів.

Ефективність консервантів у готовому лікарському засобі вважають задовільною, якщо за умов прове-

дення випробування, при зберіганні інокульованих зразків при заданій температурі, протягом зазначених проміжків часу спостерігається значне зменшення або не спостерігається збільшення, у залежності від вимог до готового лікарського засобу, числа мікроорганізмів. Критерії оцінки, що показують зменшення числа мікроорганізмів за певний період часу, залежать від потрібного ступеня захисту готових лікарських засобів (див. Таблицю 5.1.3.-1/2/3).

#### Тест-мікроорганізми

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72.
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ▲	ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83.

При випробуванні використовують монокультури перелічених мікроорганізмів. Якщо необхідно, використовують також мікроорганізми, які можуть являти ймовірне мікробне забруднення готового лікарського засобу. Наприклад, при випробуванні усіх готових лікарських засобів для орального застосування рекомендується використовувати *Escherichia coli* (ATCC 8739; NCIMB 8545; CIP 53.126), а при випробуванні готових лікарських засобів для орального застосування, що містять високі концентрації цукру, – *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92).

#### Приготування інокуляту

При підготовці до проведення випробування свіжовирощену вихідну культуру кожного із зазначених тест-мікроорганізмів ▼ пересівають на поверхню густого соєво-казеїнового живильного середовища (2.6.12) у разі вирощування бактерій або густого живильного Сабуро-декстрозного середовища без додавання антибіотиків (2.6.12) у разі вирощування грибів. ▲ Культури бактерій інкубують при температурі від 30 °C до 35 °C від 18 год до 24 год; культуру *C. albicans* інкубують при температурі від 20 °C до 25 °C протягом 48 год; культуру *A. ▼ brasiliensis* ▲ - при температурі від 20 °C до 25 °C протягом одного тижня або до одержання добре розвинутих спор. Для досягнення мікроорганізмом його оптимального стану можуть бути потрібні пересівання, однак рекомендується обмежитися мінімально можливим їх числом.

Для приготування суспензій бактеріальних культур і культури *C. albicans* мікробну масу змивають з поверхні живильного середовища стерильною суспендуючою рідиною, що містить 9 г/л натрію хлориду P ■, і переносять у придатну посудину. Потім за допомогою тєї самої рідини доводять вміст мікроорганізмів до 10<sup>8</sup> КУО у мілілітрі. Для приготування суспензії культури *A. ▼ brasiliensis* ▲ використовують

## 5.1. Загальні тексти з мікробіології

стерильну суспендуючу рідину, що містить 9 г/л *натрію хлориду* *Pi 0.5 г/л полісорбату-80 P*, і за її допомогою доводять вміст спор до  $10^8$  КУО у мілілітрі.

З кожної суспензії негайно відбирають придатний зразок і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 мл кожної суспензії методом прямого висівання на чашки або методом мембранної фільтрації (2.6.12). Одержане значення править для визначення числа життєздатних мікроорганізмів в інюкуляті і вихідного числа мікроорганізмів при проведенні випробування. Інюкулят треба використовувати негайно після приготування.

### МЕТОДИКА

Для підрахунку життєздатних мікроорганізмів у інюкульованих зразках використовують те саме густе живильне середовище, яке було використане для початкового вирощування відповідних мікроорганізмів.

Кожний контейнер з випробовуваним лікарським засобом інюкують суспензією, що містить один з тест-мікроорганізмів, забезпечуючи мікробне навантаження від  $10^5$  до  $10^6$  КУО у мілілітрі або грамі лікарського засобу. Об'єм інюкуляту має складати не більше 1 % від об'єму зразка. Ретельно перемішують для забезпечення рівномірного розподілу мікроорганізмів у зразку.

Інюкульовані зразки лікарського засобу витримують при температурі від 20 °С до 25 °С у захищеному від світла місці. З кожного випробовуваного зразка відбирають проби (звичайно 1 мл або 1 г) безпосередньо після інюкуляції і через зазначені інтервали часу, що залежить від типу лікарського засобу визначають число життєздатних мікроорганізмів методом висівання на чашки або методом мембранної фільтрації (2.6.12). Антимікробну активність готового лікарського засобу треба усунути шляхом розведення, фільтрації або за допомогою придатного інактиватора. При використанні процедури розведення треба брати до уваги зниження чутливості методу при визначенні малого числа життєздатних мікроорганізмів. При використанні інактиватора треба підтвердити шляхом контрольних дослідів, що його присутність не впливає на життєздатність мікроорганізмів. Треба підтвердити придатність методики для доказу потрібного зменшення числа життєздатних мікроорганізмів.

### КРИТЕРІЙ ПРИЙНЯТНОСТІ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ

У Табл. 5.1.3.-1/2/3 подані критерії оцінки антимікробної активності у вигляді логарифма зменшення числа життєздатних мікроорганізмів по відношенню до визначеного вихідного числа мікроорганізмів.

Таблиця 5.1.3.-1.

▼ Парентеральні лікарські засоби, очні лікарські засоби, інтрауретральні та інтрааммолярні лікарські засоби ▲

		Lg зменшення				
		6 год	24 год	7 діб	14 діб	28 діб
Бактерії	A	2	3	-	-	HВ
	B	-	1	3	-	HЗ
Гриби	A	-	-	2	-	HЗ
	B	-	-	-	1	HЗ

HВ — мікроорганізми не виявляються

HЗ — не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці. ▲

Критерій А відповідає рекомендованій ефективності. Якщо обґрунтовано, що критерій А не може бути досягнутий, наприклад, з причини підвищеного ризику несприятливих впливів, лікарський засіб має задовольняти критерію В.

Таблиця 5.1.3.-2.

▼ Вушні лікарські засоби, назальні лікарські засоби, лікарські засоби для зовнішнього застосування та лікарські засоби для інгаляцій ▲

		Lg зменшення			
		2 діб	7 діб	14 діб	28 діб
Бактерії	A	2	3	-	HЗ
	B	-	-	3	HЗ
Гриби	A	-	-	2	HЗ
	B	-	-	1	HЗ

▼ HЗ — не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці. ▲

Критерій А відповідає рекомендованій ефективності. Якщо обґрунтовано, що критерій А не може бути досягнутий, наприклад, з причини підвищеного ризику несприятливих впливів, лікарський засіб має задовольняти критерію В.

Таблиця 5.1.3.-3.

▼ Лікарські засоби для орального застосування, оромукозні та лікарські засоби для ректального застосування ▲

		Lg зменшення	
		14 діб	28 діб
Бактерії		3	HЗ
Гриби		1	HЗ

▼ HЗ — не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів у порівнянні з кількістю життєздатних мікроорганізмів у попередній контрольній точці. ▲

Наведені критерії відповідають рекомендованій ефективності.

Випробування ефективності антимікробних консервантів

**Тест-мікроорганізми.** При випробуванні ефективності антимікробних консервантів можуть бути також використані такі штами тест-мікроорганізмів:

Замість тест-мікроорганізму *Escherichia coli* ATCC 8739 (NCIMB 8545; CIP 53.126) може бути використаний тест-мікроорганізм *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922).

Замість тест-мікроорганізму *Candida albicans* ATCC 10231 (NCPF 3179; IP 48.72) може бути використаний тест-мікроорганізм *Candida albicans* УКМ У-1918 (ATCC 885-653; ГИСК 259).

Допускається використання інших штамів мікроорганізмів із узгодження з компетентним уповноваженим органом.

#### 5.1.4. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Присутність деяких мікроорганізмів в нестерильних лікарських засобах може викликати зменшення або навіть інактивацію їх терапевтичної дії та, внаслідок

цього, негативно впливати на здоров'я пацієнтів. Тому виробники мають забезпечити низький рівень біологічного забруднення готових дозованих форм шляхом виконання поточних директив належної виробничої практики (НВП, GMP) під час виробництва, пакування, зберігання та розповсюдження лікарських засобів.

Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів проводять згідно методів, наведених в статтях (2.6.12) та (2.6.13). Для нестерильних лікарських засобів критерії прийнятності, що базуються на загальному числі аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та загальному числі дріжджевих та плісневих грибів (ТУМС), наведені в Табл.5.1.4.-1, 5.1.4.-2. Критерії прийнятності ґрунтуються на результатах одного випробування, або на середньому результаті декількох повторних випробувань (наприклад, при випробуванні методом прямого висівання на чашки Петрі).

Якщо критерії прийнятності мікробіологічної чистоти визначені в окремій статті, результати інтерпретують наступним чином:

Таблиця 5.1.4.-1.

Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти готових нестерильних лікарських засобів

Шлях введення	ТАМС КУО/г або КУО/мл	ТУМС КУО/г або КУО/мл	Окремі види мікроорганізмів
Не водні лікарські засоби для орального застосування	$10^3$	$10^2$	Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г або 1 мл
Водні лікарські засоби для орального застосування	$10^2$	$10^1$	Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г або 1 мл
Для ректального застосування	$10^3$	$10^2$	
Оромукозні лікарські засоби) Для ясен Для зовнішнього застосування Для назального застосування Вушні лікарські засоби	$10^2$	$10^1$	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г або 1 мл
Для вагінального застосування	$10^2$	$10^1$	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Candida albicans</i> в 1 г або 1 мл
Трансдермальні пластири (норми для одного пластиря, включаючи липкий шар та основу)	$10^2$	$10^1$	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> на 1 пластир Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на 1 пластир
Для інгаляцій (до рідких засобів для розпилення застосовують спеціальні вимоги)	$10^2$	$10^1$	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г або 1 мл Відсутність толерантних до жовчі грамнегативних бактерій в 1 г або 1 мл
♦ Спеціальні вимоги Фармакопей до готових лікарських засобів для орального застосування, що містять сировину природного (тваринного, рослинного або мінерального) походження, для яких попередня антимікробна обробка неможлива, та для яких уповноважений компетентний орган допускає в сировині ТАМС більше за $10^3$ КУО в 1 г або 1 мл)♦	$10^4$	$10^2$	Не більше $10^3$ КУО толерантних до жовчі грамнегативних бактерій в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Salmonella</i> в 10 г або 10 мл Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл



## 5.1. Загальні тексти з мікробіології

- $10^1$  КУО максимально допустиме число = 20;
- $10^2$  КУО максимально допустиме число = 200;
- $10^3$  КУО максимально допустиме число = 2000, і т.і..

В Табл. 5.1.4.-1 наведений перелік окремих видів мікроорганізмів, для яких встановлено критерії прийнятності. Цей перелік не є вичерпним, і для окремих лікарських засобів може бути необхідним проведення випробування на наявність інших видів мікроорганізмів в залежності від природи вихідних матеріалів та виробничого процесу.

Якщо доведено, що жоден з рекомендованих методів випробування не дає можливості провести достовірне визначення відповідності числа мікроорганізмів в лікарському засобі встановленому нормуванню, то слід використовувати придатну методику з метою виявлення найбільш близькою до визначеного критерія прийнятності.

Важливість випробування на наявність інших видів мікроорганізмів, крім тих, що наведені у Табл. 5.1.4.-1, оцінюють з урахуванням наступних чинників:

- використання продукту: рівень безпеки відрізняється в залежності від шляху введення (очі, ніс, дихальні шляхи);
- природа продукту: його здатність підтримувати ріст мікроорганізмів, наявність належного антимікробного консерванту;
- спосіб застосування;
- споживач: ризик може відрізнитися для новонароджених, дітей та ослаблених пацієнтів;
- використання імуносупресорних агентів, кортикостероїдів;
- наявність хвороб, ран, пошкодження органів.

Там де це обгрунтовано, аналіз ступеню ризику суттєвих чинників здійснює персонал, який має спеціальну освіту в галузі мікробіології та інтерпретації даних мікробіологічних випробувань.

Вимоги до мікробіологічної чистоти сировини слід встановлювати з урахуванням обробки, якій піддають продукт, поточних методів випробування та доступності матеріалів певної якості.

Таблиця 5.1.4.-2  
Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти нестерильних субстанцій для фармацевтичного використання

	ТАМС КУО/г або КУО/мл	ТУМС КУО/г або КУО/мл
Субстанції для фармацевтичного застосування	$10^3$	$10^2$

◆ Рекомендовані критерії прийнятності мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів для орального застосування наведені в статті (5.1.8). ◆

### 5.1.5. ЗАСТОСУВАННЯ КОНЦЕПЦІЇ $F_0$ ПРИ ПАРОВІЙ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ВОДНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Дана стаття носить інформаційний та рекомендаційний характер.

Для процесу стерилізації насиченою парою під величиною  $F_0$  розуміють летальність мікроорганізмів (для яких теоретична величина  $Z$  дорівнює 10), визначену як еквівалентний час в хвилинах при температурі 121 °С, що забезпечується при стерилізації препарату в кінцевому контейнері.

Загальна величина  $F_0$  для процесу стерилізації враховує фази циклу нагріву й охолодження та може бути обчислена як інтеграл від ступеню летальності відносно часу в дискретних інтервалах температури.

Якщо цикл парової стерилізації вибирається на основі концепції  $F_0$ , велику увагу слід приділяти тому, щоб довести, що стерильність досягнута. На додаток до валідації процесу стерилізації може бути також необхідно проводити безперервний мікробіологічний контроль у процесі виробництва, щоб показати, що мікробіологічні параметри знаходяться у встановлених межах та дають значення ступеню надійності стерилізації (СНС)  $10^{-6}$  або краще.

Для процесу парової стерилізації величина  $Z$  встановлює зв'язок між термічною стійкістю мікроорганізмів та зміною температури. Величина  $Z$  відповідає зміні температури, що приводить до десятиразової зміни величини  $D$ .

Величина  $D$  (величина десятикратного зниження) — це значення параметра стерилізації (тривалості або поглиненої дози), необхідне для зниження числа життєздатних клітин мікроорганізмів до 10% від їх вихідного числа. Величина  $D$  має сенс тільки для точно визначених умов стерилізації.

Застосовуються наступні математичні формули:

$$F_0 = D_{121} (\log N_0 - \log N) = D_{121} \log IF$$

де:

$D_{121}$  — величина  $D$  для тест-мікроорганізмів (5.1.2) при 121 °С;

$N_0$  — початкове число життєздатних мікроорганізмів;

$N$  — кінцеве число життєздатних мікроорганізмів;

$IF$  — фактор інактивації.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

де:

$D_1$  — величина  $D$  для мікроорганізмів при температурі  $T_1$ ;

$D_2$  — величина  $D$  для мікроорганізмів при температурі  $T_2$ .

$$IF = N_0 - N = 10^t \cdot D$$

де:

$t$  — час дії;

$D$  — величина  $D$  для мікроорганізмів в умовах дії.

### 5.1.8. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЧИСТОТА РОСЛИННИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

*Цей розділ надає рекомендовані критерії прийнятності мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів.*

Присутність деяких мікроорганізмів в нестерильних лікарських засобах може викликати зменшення або навіть інактивацію їх терапевтичної дії і, внаслідок цього, негативно впливати на здоров'я пацієнтів. Тому виробники мають забезпечити низький рівень біологічного забруднення готових дозованих форм шляхом виконання поточних директив належної виробничої практики (НВП, GMP) під час виробництва, пакування, зберігання та розповсюдження лікарських засобів.

Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів проводять згідно методів, наведених в загальних 2.6.12, 2.6.13 та 2.6.31. Для нестерильних лікарських засобів критерії прийнятності, що базуються на загальному числі аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та загальному числі дріжджевих та плісневих грибів (ТУМС) наведені нижче.

Критерії прийнятності ґрунтуються на результатах одного випробування, або на середньому результаті декількох повторних випробувань (наприклад, при випробуванні методом прямого висівання на чашки Петрі).

Перелік окремих видів мікроорганізмів для яких встановлено критерії прийнятності наведений нижче. Цей перелік не є вичерпним, і для окремих лікарських засобів може бути необхідним проведення випробування на наявність інших видів мікроорганізмів в залежності від природи вихідних матеріалів та виробничого процесу.

**А. Рослинні лікарські засоби, що містять рослинну сировину з допоміжними речовинами або без них, що призначені для приготування настоек та відварів, з використанням окропу (наприклад трав'яні чаї, з ароматизаторами або без них)**

ТАМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^7$ КУО/г Максимально допустиме число: 50 000 000 КУО/г
ТУМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^5$ КУО/г Максимально допустиме число: 500 000 КУО/г
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Критерій прийнятності: $10^3$ КУО/г
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Відсутність в 25 г

**В. Рослинні лікарські засоби, що містять, наприклад, екстракти і/або рослинну сировину, з допоміжними речовинами або без них, для яких спосіб отримання (наприклад, екстракція) або спосіб попередньої обробки для рослинної сировини забезпечують зменшення мікробного забруднення до рівня, встановленого для цієї категорії.**

ТАМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^4$ КУО/г або КУО/мл Максимально допустиме число: 50 000 КУО/г або КУО/мл
ТУМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^3$ КУО/г або КУО/мл Максимально допустиме число: 500 КУО/г або КУО/мл
Толерантні до жовчі грамнегативні бактерії (2.6.31)	Критерій прийнятності: $10^2$ КУО/г або КУО/мл
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Відсутність в 1 г або 1 мл
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Відсутність в 25 г або 25 мл

**С. Рослинні лікарські засоби, що містять, наприклад, екстракти і/або рослинну сировину, з допоміжними речовинами або без них, для яких може бути доведено, що спосіб отримання (наприклад, екстракція за допомогою спирту з низькою концентрацією або не киплячою водою, або низькотемпературне концентрування) або, спосіб попередньої обробки для рослинної сировини, не забезпечують зменшення мікробного забруднення до рівня, встановленого для категорії В.**

ТАМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^5$ КУО/г або КУО/мл Максимально допустиме число: 500 000 КУО/г або КУО/мл
ТУМС (2.6.12)	Критерій прийнятності: $10^4$ КУО/г або КУО/мл Максимально допустиме число: 50 000 КУО/г або КУО/мл
Толерантні до жовчі грамнегативні бактерії (2.6.31)	Критерій прийнятності: $10^4$ КУО/г або КУО/мл
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Відсутність в 1 г або 1 мл
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Відсутність в 25 г або 25 мл

*Визнано, що для деяких рослинних лікарських засобів критерії прийнятності для ТАМС/ТУМС та толерантних до жовчі грамнегативних бактерій, які наведені вище для категорій А, В або С, не можуть бути досягнуті із-за типового рівня мікробного забруднення. В такому випадку можуть бути використані більш високі критерії прийнятності на основі оцінки ризику з урахуванням якісної та кількісної характеристики мікробного забруднення та показань до медичного застосування лікарського засобу.*

Якщо доведено, що жоден з рекомендованих методів випробування не дає можливості провести достовірне визначення відповідності числа мікроорганізмів в лікарському засобі встановленому нормуванню, то

## 5.1. Загальні тексти з мікробіології

слід використовувати придатну методику з межею виявлення найбільш близькою до критерію прийнятності.

### 5.1.9. РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ВИПРОБУВАННЯ НА СТЕРИЛЬНІСТЬ

Наведена методика випробування на стерильність (2.6.7) так само, як і всі інші фармакопейні методики, призначена для того, щоб дати змогу незалежному контролюючому органу встановити, чи відповідає конкретний лікарський засіб вимогам Фармакопеї. Виробник не зобов'язаний дотримуватися наведених методик, він може вносити в них зміни або використовувати інші, якщо гарантує, що при випробуванні описаними вище офіційними методами його продукція буде відповідати вимогам Фармакопеї.

**Запобігання мікробного забруднення.** Асептичні умови при випробуванні на стерильність можуть бути досягнуті, наприклад, використанням ламінар-боксу класу А, розташованого у чистому приміщенні класу В, або ізолятора.

**Рекомендації виробникам.** Рівень надійності, з яким за задовільним результатом випробування на стерильність (відсутність нестерильних контейнерів у зразку) можна зробити висновок про якість всієї серії, залежить від однорідності серії, умов виробництва і прийнятого порядку відбору проб. У даній статті під серією розуміють сукупність герметично закупорених контейнерів, вироблених таким чином, що під час виробничого процесу ризик мікробного забруднення однаковий для кожного з них.

Якщо лікарський засіб піддається процедурі кінцевої стерилізації, результати автоматичного контролю обґрунтованих із точки зору біології фізичних параметрів, що підтверджують дотримання встановлених режимів при стерилізації серії, характеризують її стерильність з більшою надійністю за результати випробування на стерильність. Умови, в яких допускається випуск за параметрами, наведені у статті «Методи приготування стерильних продуктів» (5.1.1). Для підтвердження дотримання асептичних умов у процесі виробництва може бути використаний метод наповнення живильними середовищами. Однак випробування на стерильність є єдиним аналітичним методом, що дозволяє оцінити стерильність лікарського засобу, виготовленого в асептичних умовах, і, крім того, у будь-якому разі це єдиний аналітичний метод, що дозволяє оцінити стерильність зразка лікарського засобу при проведенні експертизи.

При проведенні випробування на стерильність можливість виявлення мікроорганізмів прямо пропорційна їх кількості у випробовуваному зразку і залежить від здатності цих мікроорганізмів давати видимий ріст на живильних середовищах за умов

випробування. Ймовірність виявлення мікроорганізмів мала при дуже низькому рівні забруднення лікарського засобу навіть при рівномірному мікробному забрудненні серії. Інтерпретація результатів випробування на стерильність ґрунтується на тому припущенні, що одержувані результати були б ідентичні для кожного контейнера, що входить до складу серії. Оскільки випробування кожного контейнера провести неможливо, необхідно розробити план відбору проб. При випробуванні продукції, виробленої за асептичних умов, рекомендується відбирати контейнери, наповнені на початку і в кінці серії, а також після впливу істотних перешкод.

**Облік та інтерпретація результатів.** Для ідентифікації мікроорганізмів, виявлених у лікарському засобі при випробуванні на стерильність, добре підходять мікробіологічні/біохімічні методи Європейської Фармакопейної Конвенції. Однак, якщо виробник хоче визнати результати випробування на стерильність невірними тільки на підставі умови (d), для доказу ідентичності мікроорганізмів, виділених з лікарського засобу, і матеріалів, що використовувалися при випробуванні, або з навколишнього середовища може бути необхідно використовувати чутливі методи типування. Незважаючи на те, що за допомогою класичних методів мікробіологічної/біохімічної ідентифікації можна довести, що два ізоляти не є ідентичними, ці методи можуть бути недостатньо чутливими або надійними для того, щоб однозначно визнати, що два ізоляти походять з одного джерела. Більш чутливі методи, наприклад, молекулярне типування гомологічності РНК/ДНК, можуть стати необхідними для доказу того, що мікроорганізми є наступниками однієї клітини і походять із одного джерела.

### 5.1.10. РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ВИПРОБУВАННЯ НА БАКТЕРІАЛЬНІ ЕНДОТОКСИНИ

#### 1. ВСТУП

Ендоотоксини, джерелом яких є грамнегативні мікроорганізми, є найбільш розповсюдженою причиною токсичних реакцій, які виникають при забрудненні лікарських засобів пірогенами; їхня пірогенна активність набагато вища, ніж активність більшості інших пірогенних речовин. Ці ендоотоксини є ліпополісахаридами. Незважаючи на те, що є незначна кількість пірогенів іншої хімічної природи, які мають різну структуру, звичайно саме відсутність бактеріальних ендоотоксинів у лікарському засобі має на увазі відсутність пірогенних компонентів, за умови, що наявність пірогенних речовин, які не є ендоотоксинами, можна виключити.

Наявність ендоотоксинів у лікарському засобі може маскуватися факторами, що заважають реакції між

ендотоксинами та лізатом амебоцитів. Отже, при бажанні замінити передбачене окремою статтею випробування на пирогени на кроликах випробуванням на бактеріальні ендотоксини необхідно довести, що це випробування може бути здійснене для даного лікарського засобу; для цього може знадобитись розробка процедури усунення заважаючих факторів.

Перш ніж розглядати можливість використання випробування на бактеріальні ендотоксини стосовно конкретного лікарського засобу, необхідно одержати таку інформацію.

Встановити придатність матеріалів, використовуваних для проведення випробування. Має бути гарантована відсутність ендотоксинів у воді для БЕТ й інших реактивах; необхідно перевірити заявлену виробником чутливість лізату амебоцитів.

Оскільки випробовуваний лікарський засіб може бути перешкодою для результатів випробування, чутливість лізату визначають у присутності та відсутності цього лікарського засобу. Між двома значеннями чутливості не має бути істотного розходження.

У методі випробування на бактеріальні ендотоксини (2.6.14) мають зазначати методи усунення заважаючих факторів; при наявності заважаючих факторів потрібно усунути заважаючі фактори підходящим методом, провести перевірку усунення заважаючих факторів та провести інше випробування.

Даний розділ пояснює причини вимог випробування на бактеріальні ендотоксини і крім того надає інформацію щодо обліку й інтерпретації результатів.

Заміна випробування на пирогени на кроликах випробуванням з використанням лізату амебоцитів фактично означає використання альтернативного методу аналізу і, отже, має потребу у валідації; у розділі 11 наведені деякі вказівки про те, як треба чинити.

У окремій статті на лікарський засіб зазначають основний метод проведення випробування на бактеріальні ендотоксини. Якщо метод не зазначений, метод А використовують як основний метод. Якщо передбачається використовувати метод, відмінний від основного, необхідно довести, що цей метод є придатним для даного лікарського засобу і дає результати, що узгоджуються з одержаними за основним методом (див. також розділ 13).

## 2. МЕТОД

Додавання ендотоксинів до лізату амебоцитів може призвести до появи каламутності, утворенню осаду або гелю (метод гелеутворення). При проведенні випробувань на бактеріальні ендотоксини для першої групи методів як критерій оцінки в Фармакопеї використовувався тільки гелетромб метод. Перевагою цього методу є простота вирішення про те, чи витримав зразок лікарського засобу випробування

на основі наявності або відсутності гелеутворення, видимого неозброєним оком. Кількісні методи, описані як методи С, D, E і F, були розроблені пізніше; для їх виконання необхідна більша кількість обладнання, але їх легше автоматизувати для цілей регулярних випробувань великих кількостей зразків одного і того самого лікарського засобу.

Ендотоксини можуть адсорбуватися на поверхні пробірок і піпеток, виготовлених з деяких видів пластика або типів скла. Можуть виникнути перешкоди, зумовлені вивільненням речовин із пластикових матеріалів. Отже, використовувані матеріали треба перевіряти; наступні партії пробірок або піпеток можуть незначно відрізнятись за складом, і, тому, рекомендується повторювати такі випробування, починаючи працювати з новими партіями матеріалів.

Рішення використовувати випробування на бактеріальні ендотоксини як граничного випробування має на увазі, по-перше, що для лікарських засобів, які підлягають випробуванню, треба визначити межу вмісту ендотоксинів і, по-друге, необхідно знати, чи перевищує вміст ендотоксинів у випробовуваному зразку цю граничну межу, чи її значення нижче цієї величини. Кількісні методи С, D, E і F роблять можливим визначення вмісту ендотоксинів у випробовуваному зразку, але при встановленні відповідності зразка вимогам Фармакопеї та проведенні контролю якості за рутинною методикою заключне питання полягає в тому, чи перевищує цей вміст певну межу.

При встановленні межі вмісту ендотоксину для випробовуваного зразка треба приділити належну увагу дозі випробовуваного лікарського засобу для людини. Мета цього полягає в тому, щоб гарантувати, що доти, поки вміст ендотоксинів у зразку залишається нижчим за межу, навіть максимальна доза лікарського засобу, введена зазначеним шляхом за годину, не буде містити такої кількості ендотоксинів, що викликає токсичну реакцію.

Якщо вміст ендотоксинів у зразку точно дорівнює граничній величині, як і в тому випадку, коли вміст ендотоксинів значно вищий за цю величину, відбувається гелеутворення, і зразок не проходить випробування, оскільки характер випробування «усе або нічого» робить неможливим розмежування вмісту, що точно дорівнює граничній концентрації, і вмісту, що перевищує граничну концентрацію. Тільки в тому разі, коли гелеутворення не спостерігається, можна зробити висновок, що концентрація ендотоксинів нижча за межу вмісту.

Для лікарських засобів для парентерального застосування у вигляді порошків цей граничний вміст ендотоксину на одиницю маси або на Міжнародну одиницю (МО) лікарського засобу треба перевести у вміст ендотоксинів на мілілітр розчину, який підлягає випробуванню, оскільки випробування може бути проведене лише для розчину. Випадок, коли

## 5.1. Загальні тексти з мікробіології

лікарські засоби вже перебувають в рідкому стані (наприклад, інфузійні розчини), обговорюється нижче.

*Граничний вміст ендотоксинів* для лікарських засобів, що вводяться парентерально, розраховують за формулою:

$$\frac{K}{M}$$

де:

*K* — гранична пірогенна доза ендотоксину на кілограм маси тіла,

*M* — максимальна рекомендована разова доза лікарського засобу на кілограм маси тіла.

Якщо препарат у вигляді ін'єкцій підлягає частому введенню через невеликі проміжки часу або неперервному введенню у вигляді інфузій, то *M* — це максимальна сумарна доза, введена на протязі 1 години.

*Граничний вміст ендотоксинів* залежить від лікарського засобу і шляху його введення і зазначається в окремих статтях. Значення *K* зазначені в Табл. 5.1.10-1.

Для інших шляхів уведення лікарського засобу критерій прийнятності для нормування бактеріальних ендотоксинів визначають на основі результатів, одержаних при розробці даного лікарського засобу.

Таблиця 5.1.10-1

Шлях введення	<i>K</i> (МО ендотоксину на кілограм маси тіла)
Внутрішньовенне	5.0
Внутрішньовенне, для радіофармацевтичних лікарських засобів	2.5
Інtrateкально	0.2

Яке розведення лікарського засобу треба використовувати у випробуванні для того, щоб бути впевненими у тому, що негативний результат випробування свідчить про те, що концентрація ендотоксинів у ньому нижча за межу вмісту ендотоксинів, а позитивний результат означає, що лізатом визначається вміст, що дорівнює або перевищує межі вмісту ендотоксинів. Ступінь розведення у даному випадку залежить від межі вмісту ендотоксинів і чутливості лізату; вона називається «Максимально допустимим розведенням» (МДР), і її величину можна одержати розрахунковим шляхом за формулою:

$$МДР = \frac{\text{граничний вміст ендотоксинів} \times \text{концентрація випробовуваного розчину}}{\lambda}$$

Концентрація випробовуваного розчину:

— мг/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю маси (МО/мг),

— Одиницях/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю біологічної активності (МО/Одиницю),

— мл/мл, якщо граничний вміст ендотоксинів зазначений на одиницю об'єму (МО/мл).

$\lambda$  — зазначена на етикетці чутливість лізату (МО/мл) у гелі-тромб методі або точка з самою низькою концентрацією на стандартній кривій у турбидиметричному методі або хромогенному методі.

Якщо величина максимально допустимого розведення не є цілим числом, для рутинних цілей можна використовувати найближче ціле число, менше за МДР (що означає, що розчин лікарського засобу розводять у меншому ступені за МДР). У такому разі негативний результат випробування показує, що вміст ендотоксинів у зразку нижчий за граничну величину. Однак, якщо концентрація ендотоксинів у зразку при проведенні випробування нижча за межу вмісту ендотоксинів, але достатньо висока для того, щоб реакція з лізатом призвела до утворення гелю, випробування за цих умов може бути позитивним. Отже, якщо випробування з таким «зручним» коефіцієнтом розведення є позитивним, зразок треба розбавити до МДР і повторити випробування. У випадку будь-яких сумнівів треба використовувати МДР.

Це підкреслює важливість підтвердження чутливості лізату.

### Приклад

Треба провести випробування для розчину 50 мг/мл натрію фенітоїну, призначеного для внутрішньовенного введення. Визначають МДР, задаючи такі значення змінних:

*M* — максимальна доза для людини становить 15 мг на кілограм маси тіла,

*c* — 50 мг/мл,

*K* — 5 МО ендотоксину на кілограм маси тіла,

$\lambda$  — 0.4 МО ендотоксину на мілілітр.

$$МДР = \frac{5 \times 50}{15} \times \frac{1}{0.4} = 41.67$$

Для рутинних випробувань цього лікарського засобу може бути доцільним розвести 1 мл випробовуваного розчину до 20 мл (величина МДР/2 заокруглена до більш низького цілого числа). Однак, результат цього випробування є позитивним, необхідно розвести 1 мл до 41.67 мл і повторити випробування. Розведення до 41.67 мл необхідне також у тих випадках, коли випробування виконують для перевірки сумнівних результатів.

## 3. СТАНДАРТНИЙ ПРЕПАРАТ

Як стандартний препарат використовують *БСП ендотоксину*. Його кількісний аналіз проведений порівняно з міжнародним стандартом ВООЗ, а його активність виражена у МО ендотоксину на ампулу. МО ендотоксину визначається як специфічна активність певної маси міжнародного стандарту.

Для рутинних цілей може бути використаний інший стандартний препарат ендотоксину, за умови, що проведено його кількісний аналіз порівняно з міжнародним стандартом ендотоксину або *БСП ендотоксину* та його активність виражена в МО ендотоксину.

*ПРИМІТКА: МО ендотоксину відповідає одній Ендотоксиновій одиниці (ЕО).*

#### 4. ВОДА ДЛЯ БЕТ

Визначення відсутності ендотоксину в цьому реактиві у випробуванні на пірогени на кроликах відхилено з практичних і теоретичних причин:

- кролик не має чутливості, достатньої для того, щоб визначити ендотоксин у воді для БЕТ, призначений для проведення випробувань для зразків з дуже низькою граничною концентрацією ендотоксинів ;
- внаслідок відносно низької точності температурної реакції у кроликів потрібно було б багато повторних випробувань;
- терміни «пірогени» і «ендотоксини» позначають групи речовин, які не повністю співпадають одна з одною.

При описі випробування на бактеріальні ендотоксини (2.6.14.) показано, що для приготування води для БЕТ можуть бути використані методи, відмінні від потрібної перегонки. Із позитивними результатами було використано метод зворотного осмосу. Можна віддати перевагу дистилюванню води більше трьох разів. Який би метод не використовувався, одержаний реактив має бути вільний від ендотоксинів, які визначаються.

#### 5. рН СУМІШІ

Оптимальне гелеутворення суміші у випробуванні на бактеріальні ендотоксини спостерігається при рН 6.0-8.0. Однак, додавання лізату до зразка може призвести до зниження рН.

#### 6. ВАЛІДАЦІЯ ЛІЗАТУ

При приготуванні розчинів лізату важливо дотримуватись інструкції виробника.

Позитивні коефіцієнти розведення у гель-тромб методах А та В переводять у логарифми. Причина цього полягає в тому, що, якщо побудувати криву розподілу за частотою цих логарифмічних величин, вона звичайно наближається до кривої нормального розподілу набагато ближче ніж крива розподілу за частотою самих коефіцієнтів розведення; фактично вони настільки подібні, що допускається використання нормального розподілу за частотою як математичної моделі й обчислення меж, взятих за основу порівняння, за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

#### 7. ПОПЕРЕДНЄ ВИПРОБУВАННЯ НА ЗАВАЖАЮЧІ ФАКТОРИ

Деякі лікарські засоби не можна піддавати випробуванню на наявність ендотоксинів безпосередньо, бо вони не змішуються з реактивами, не можуть бути доведені до рН 6.0-8.0 або інгібують, або активують гелеутворення. Отже, потрібне проведення попереднього випробування для перевірки наявності заважаючих факторів. Якщо вони виявлені, необхідно продемонструвати, що процедура їхнього видалення є ефективною.

Мета попереднього випробування — перевірити нульову гіпотезу про те, що чутливість лізату в присутності випробовуваного зразка не відрізняється значимо від його чутливості у відсутності зразка. У методах А і В використовують простий критерій: нульова гіпотеза приймається, якщо чутливість лізату у присутності зразка становить, принаймні, 0.5 чутливості самого лізату і не більше як удвічі перевищує цю величину.

Класичним підходом було б обчислення середніх значень логарифма коефіцієнта розведення для чутливості лізату у присутності й у відсутності зразка й перевірка різниці між двома середніми значеннями за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Випробування на заважаючі фактори у гель-тромб методах А і В вимагає використання зразка лікарського засобу, в якому ендотоксини не виявлені. Це являє теоретичну проблему, якщо необхідно випробовувати зовсім новий лікарський засіб. Для кількісних методів С, D, E та F передбачений інший підхід.

#### 8. УСУНЕННЯ ЗАВАЖАЮЧИХ ФАКТОРІВ

Способи усунення заважаючих факторів не мають призводити до підвищення або зниження кількості ендотоксину у випробовуваному зразку (наприклад, зниженні в результаті адсорбції). Для перевірки цього до випробовуваного зразка додають відому кількість ендотоксину і потім після усунення заважаючих факторів вимірюють кількість виявленого ендотоксину.

*Методи С і D.* Якщо властивості випробовуваного лікарського засобу виявляють заважаючу дію, яку не можна усунути класичними методами, можлива побудова стандартної кривої для аналогічного лікарського засобу, звільненого від ендотоксинів за допомогою належної обробки або розведення. Потім проводять випробування на ендотоксини у порівнянні з цією стандартною кривою.

Установлено, що в багатьох випадках підходящим методом є ультрафільтрація крізь асиметричні мембранні фільтри з триацетату целюлози. Фільтри мають відповідним чином пройти валідацію, оскільки іноді похідні целюлози (D-глюкани) можуть викликати помилково позитивні результати.

## 5.1. Загальні тексти з мікробіології

Установлено, що полісульфонові фільтри є непридатними і при їх використанні були одержані помилково позитивні результати.

### 9. МЕТА ПРОВЕДЕННЯ КОНТРОЛЬНИХ ВИПРОБУВАНЬ

Метою контролю, що містить воду для БЕТ і стандартний препарат ендотоксину з концентрацією, що у два рази перевищує зазначену на етикетці чутливість лізату, є підтвердження активності лізату при проведенні випробування за передбачених для цього умов. Метою негативного контролю є підтвердження відсутності визначуваної концентрації ендотоксину у воді для БЕТ.

Позитивний контроль, що містить випробовуваний зразок у концентрації, використовуваній у випробуванні, призначений для того, щоб показати відсутність інгібуючих факторів за умов проведення випробування.

### 10. ОБЛІК ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Незначні кількості ендотоксинів у воді для БЕТ або в будь-якому іншому реактиві, або матеріалі, впливу якого піддається ЛАЛ-реактив при проведенні випробування, можуть не визначатися доти, доки вони не досягнуть межі чутливості лізату. Однак вони можуть підвищувати кількість ендотоксину в розчині, що містить випробовуваний зразок, до величини, що ледве перевищує межу чутливості, і викликати позитивну реакцію.

Ризик того, що це відбудеться, може бути знижений шляхом перевірки води для БЕТ й інших реактивів за допомогою найбільш чутливого з усіх наявних лізатів або принаймні більш чутливого за лізат, використовуваній при випробуванні зразка. Навіть у цьому разі ризик такого «помилково позитивного результату» не можна цілком виключити. Однак треба розуміти, яка щодо цього методика випробування є «безпечною щодо невдачі» на відміну від методики, яка допускає випробування, що дає помилково негативний результат, що може призвести до випуску недоброякісного лікарського засобу, небезпечного для здоров'я пацієнта.

### 11. ЗАМІНА ВИПРОБУВАННЯ НА ПІРОГЕНИ НА КРОЛИКАХ ВИПРОБУВАННЯМ НА БАКТЕРІАЛЬНІ ЕНДОТОКСИНИ

Окремі статті на лікарські засоби, призначені для парентерального застосування, що можуть містити токсичні кількості бактеріальних ендотоксинів, вимагають проведення або випробування на пірогени на кроликах, або випробування на бактеріальні ендотоксини. Загальні рекомендації:

— окремі статті, що передбачають проведення випробування, можуть включати тільки одне ви-

пробування: або випробування на пірогени на кроликах, або випробування на бактеріальні ендотоксини.

- при відсутності доказів навпаки випробування на бактеріальні ендотоксини є кращим за випробування на кроликах, оскільки вважається, що випробування на бактеріальні ендотоксини забезпечує рівноцінну або більшу безпеку для здоров'я пацієнта.
- до включення випробування на бактеріальні ендотоксини в окрему статтю потрібно довести, що лікарський засіб, який розглядається, може бути підданий випробуванню на бактеріальні ендотоксини одним з методів, зазначених у розділі 2.6.14.
- необхідна відповідна інформація від виробників; компанії мають представити усі валідаційні дані, які являють інтерес і які у них є для проведення випробування на бактеріальні ендотоксини у субстанціях та лікарських засобах; такі дані включають деталі пробопідготовки зразка і всі процедури, необхідні для усунення заважаючих факторів; крім того мають бути подані всі наявні в розпорядженні дані про паралельні випробування на кроликах, які б гарантували, що заміна випробування на пірогени на кроликах випробуванням на бактеріальні ендотоксини є доцільною.

Додаткові вимоги зазначені у наступних розділах.

### 12. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ВИПРОБУВАННЯ НА БАКТЕРІАЛЬНІ ЕНДОТОКСИНИ, НЕ ОПИСАНИХ У ДАНІЙ СТАТТІ

Якщо зазначене проведення випробування на бактеріальні ендотоксини і жоден із шести методів (від А до F), описаних у даній статті, не зазначений, для такого лікарського засобу вважається дійсним гелітромб метод А (граничне випробування). Якщо зазначений один з інших методів (від В до F), тоді саме він є дійсним для даного лікарського засобу.

### 13. ВАЛІДАЦІЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ

Заміна випробування на пірогени на кроликах випробуванням на бактеріальні ендотоксини або заміна існуючого методу випробування на бактеріальні ендотоксини іншим методом має розглядатися як використання альтернативного методу при заміні фармакопейного випробування, як описано в розділі 1. «Загальні зауваження»:

«Випробування та методики кількісного визначення, наведені у Фармакопеї, є офіційними методиками, проте за узгодженням із компетентним уповноваженим органом можуть використовуватися й інші методики, за умови, що ці методики дають результати, які відповідають фармакопейним методикам. У випадку сумнівів або розбіжностей вирішальною є фармакопейна методика».

Для валідації методу випробування на бактеріальні ендотоксини, відмінного від зазначеного в окремій статті, пропонуються наступні методичні рекомендації.

13-1. Методики, матеріали і реактиви, використовувані згідно даного методу, мають пройти валідацію, як описано для даного випробування.

13-2. Наявність заважаючих факторів (і якщо необхідно, спосіб їх усунення) треба випробовувати на зразках, відібраних принаймні з трьох виробничих серій. Треба мати на увазі, що для хромогенних методів D і E потрібні реактиви, які не застосовуються для методів A, B, C та F, і, отже, відповідність методів A, B, C та F вимогам щодо заважаючих факторів не можна екстраполювати на метод D або метод E без додаткового випробування.

#### 14. ВАЛІДАЦІЯ ВИПРОБУВАННЯ ДЛЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Рекомендації, описані в п.п. 13.1 і 13.2, треба застосовувати до всіх нових лікарських засобів, що призначені для парентерального застосування і таких, що підлягають випробуванню на наявність бактеріальних ендотоксинів відповідно до вимог Фармакопеї.

Для твердих лікарських засобів рекомендується використовувати величину «Мінімально допустима концентрація» (МДК). МДК є мінімально допустимою концентрацією випробовуваного розчину, за якої можливе визначення граничного вмісту ендотоксинів. МДК визначають, використовуючи таку формулу:

$$\text{МДК} = \lambda / \text{ГВ}$$

де:

$\lambda$  — зазначена на етикетці чутливість лізату (МО/мл) у гель-тромб методі або точка з найменшим значенням на стандартній кривій у турбідиметричному або хромогенному методах.

ГВ — граничний вміст ендотоксинів для лікарського засобу, зазначений на одиницю маси (МО/мг);

Контейнери для фармацевтичного застосування, для яких в окремій статті передбачений контроль пірогенів, можна піддавати випробуванню на пірогени на кроликах або випробуванню на бактеріальні ендотоксини.



## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

### 5.2. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ НА БІОЛОГІЧНІ ПРОДУКТИ

#### 5.2.2. КУРЯЧІ ЗГРАЇ, ВІЛЬНІ ВІД СПЕЦИФІЧНИХ ПАТОГЕНІВ, ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ВАКЦИН

Курей, ембріони або культури клітин, використовувани при виробництві та контролі якості вакцин, де зазначено, одержують з яєць курей зі зграй, вільних від специфічних патогенів (ВСП, SPF). SPF-статус зграї забезпечується комплексом заходів, зазначених нижче. Наведений перелік мікроорганізмів заснований на сучасних знаннях і при потребі може бути доповнений.

Зграєю називають групу птахів, що утримуються на одній ділянці, за якими доглядають особи, що не контактують із не SPF-зграями. У сформовані зграї не вводять нових не SPF-птахів.

Кожну зграю утримують в умовах, що дозволяють мінімізувати ризик контамінації. SPF-зграї не мають розміщуватися поряд з не SPF-птахами, окрім тих випадків, коли сусідня зграя перебуває в процесі встановлення SPF-статусу й утримується в аналогічних з SPF-зграєю пристроях і умовах. SPF-зграї утримують в ізоляторах або в приміщеннях, забезпечених приладами, що здатні фільтрувати та регулювати атмосферний тиск. Вживають відповідних заходів для запобігання проникнення гризунів, диких птахів, комах а також неповноваженого персоналу.

Уповноважений персонал, що має доступ до приміщення, не має контактувати з іншими птахами або іншими потенційно інфекційними для зграї агентами. Персоналу рекомендується приймати душ, змінювати одяг або надягати спеціальний одяг перед входом до контрольованих приміщень.

Матеріали, що вносяться до приміщень, по можливості, стерилізують. Зокрема, рекомендується відповідним чином обробляти корм щоб уникнути проникнення небажаних мікроорганізмів. Вода, принаймні, має бути питною із хлорованого джерела. У зграї птахів не застосовують ліків, які можуть взаємодіяти з будь-яким захворюванням, що детектується.

Постійно документують загальні спостереження здоров'я зграї і досліджують появу будь-яких аномальних ознак. Контролюють такі фактори: захворюваність, смертність, загальний фізичний стан, споживання їжі, щоденне виробництво яєць і якість яєць, плодючість і висиджування. Записи зберігають протягом не менше 5 років. Про будь-які відхилення від установлених параметрів або при виявленні будь-яких інфекцій якомога оперативніше інформують споживачів яєць.

Випробування або комбінація тестів, наведених нижче, повинні мати підходящу специфічність і чут-

ливість до характерних для серотипів вірусів. Випробовувані зразки відбирають за статистично обґрунтованою схемою.

Виявлення вірусу курячої анемії (ВКА, CAV) не завжди веде до виключення матеріалу, отриманого зі зграй, але живі вакцини, призначені для застосування у птахів, вік яких менше 7 діб, мають бути одержані тільки з CAV-негативних зграй. Інактивовані вакцини, призначені для застосування у птахів, вік яких менше 7 діб, можуть бути отримані з використанням матеріалів зі зграй, для яких не підтверджена відсутність CAV, але показано, що процесами обробки інактивується CAV.

#### СТВОРЕННЯ SPF-ЗГРАЇ

SPF-зграї формують із курей, вільних від спадково переданих інфекцій, зазначених у Табл. 5.2.2.-1. Це досягається випробуванням двох поколінь, передуючих номінації SPF-зграй. Загальна схема процедур, що проводяться для створення і підтримки SPF-зграй, наведена в Табл. 5.2.2.-2. Для створення нової SPF-зграї мають бути досліджені три покоління птахів. Усі птахи першого покоління (до віку 20 тижнів) як мінімум один раз мають бути протестовані на відсутність групового антигена курячого лейкозу та досліджені методом імуноферментного аналізу (ІФА, ЕІА) або нейтралізацією вірусу (НВ, VN) на відсутність антитіл до вірусів курячого лейкозу субтипів А, В і J. Усі птахи також мають бути тестовані на відсутність антитіл до спадкових агентів, зазначених у Табл. 5.2.2.-1. Починаючи з 8-тижневого віку, зграї тестують на відсутність *Salmonella*. Клінічні дослідження у зграї проводять, починаючи з 8-тижневого віку; птахи не мають виявляти жодних ознак інфекційних захворювань. Використовувані методи випробувань наведені в таблиці та нижче, в розділі «Рутинні випробування SPF-названих зграй». З 20-тижневого віку птахів зграї тестують, як зазначено в розділі «Рутинні випробування SPF-названих зграй». Усі стадії цієї програми випробувань застосовують для подальших двох поколінь, окрім випробування кожного птаха на спадково передавані агенти до висиджування. Для присвоєння третьому поколінню випробовуваних птахів SPF-статусу всі результати випробувань мають указувати на відсутність патогенів у всіх трьох поколіннях птахів зграї.

Можуть бути використані SPF-ембріони, одержані з іншої SPF-названої зграї, яку утримують в окремому приміщенні цієї ж ділянки. З 8-тижневого віку ці замінені птахи розглядаються як зграя і тестуються на відповідність випробуванням, наведеним вище.

#### ПОЧАТКОВІ ВИМОГИ ДО ТЕСТУВАННЯ ПОДАЛЬШИХ ПОКОЛІНЬ SPF-НАЗВАНИХ ЗГРАЙ

Для присвоєння SPF-статусу новій зграї, яка формується виключно з SPF-зграї, попередньо тестують нове покоління.

Для птахів, вік яких дорівнює або перевищує 8 тижнів, разом із випробуваннями на відсутність *Salmonella*, моніторингом загального здоров'я і відтворюваності зграї проводиться ряд специфічних випробувань. Випробування проводять у двох повторках на вибірці, що становить 5 % зграї (не менше 10, але не більше 200 птахів), відібраних з інтервалом не менше 4 тижнів між віком 12-16 тижнів і 16-20 тижнів.

Усі зразки відбирають і тестують окремо. Зразки крові відбирають для випробувань на антитіла та антиген лейкозу. Використовувані методи випробувань наведені в розділі «Рутинні випробування SPF-названих зграй». Тільки підтвердження в усіх випробуваннях відсутності інфекцій дає підстави новому поколінню називатися SPF-зграєю.

### РУТИННІ ВИПРОБУВАННЯ SPF-НАЗВАНИХ ЗГРАЙ

*Загальні спостереження й аутопсія.* Клінічні дослідження з метою підтвердження відсутності пташи-

них поксвірусів і відсутності ознак будь-яких інших інфекцій проводять не рідше одного разу на тиждень протягом усього життя зграї. У разі загибелі більше 0.2 % птахів зграї за тиждень проводять аутопсію всіх наявних тушок для підтвердження відсутності інфекції. Де застосовно, для підтвердження діагнозу проводять відповідні гістопатологічні й/або мікробіологічні/вірусологічні дослідження. Проводять специфічні випробування з виявлення туберкульозних заражень, а також підтверджують відсутність *Mycobacterium avium* методом забарвлення гістологічних зразків при будь-яких сумнівних ураженнях. У вмісті сліпої кишки всіх наявних тушок наведеним нижче методом проводять мікробіологічне визначення наявності *Salmonella spp.* У певних випадках можуть бути об'єднані зразки вмісту сліпої кишки більше 5 птахів.

*Випробування на Salmonella spp.* Випробування на *Salmonella spp.* проводять із використанням зразків посліду або мазків клоаки, або мазків приготованих препаратів. При дослідженні посліду та мазків клоаки тестування проводиться на 60 зразках через кожні 4 тижні протягом усього життя зграї.

Таблиця 5.2.2.-1

Інфекційний агент	Метод дослідження**	Спадкова інфекція	Розповсюдження швидко/повільно
Курячі аденовіруси групи 1	AGP, EIA	так	повільно
Вірус курячого енцефаломієліту	AGP, EIA	так	швидко
Вірус курячого інфекційного бронхіту	HI, EIA	немає	швидко
Вірус курячого інфекційного ларинготрахеїту	VN, EIA	немає	повільно
Віруси курячого інфекційного лейкозу	EIA для вірусів VN, EIA для антитіл	так	повільно
Вірус курячого нефриту	IS	немає	повільно
Курячі орторевіруси	IS, EIA	так	повільно
Вірус курячого ретикулоендотеліозу	AGP, IS, EIA	так	повільно
Вірус курячої анемії	IS, EIA, VN	так	повільно
Вірус синдрому зниження яйценосності	HI, EIA	так	повільно
Вірус інфекційного захворювання синовіальної сумки	Серотип 1: AGP, EIA, VN Серотип 2: VN	немає	швидко
Вірус грипу А	AGP, EIA, HI	немає	швидко
Вірус хвороби Марєка	AGP	немає	швидко
Вірус хвороби Ньюкастла	HI, EIA	немає	швидко
Вірус індичого ринотрахеїту	EIA	немає	повільно
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Agg і HI для підтвердження позитивного тесту, EIA, HI	так	повільно
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Agg і HI для підтвердження позитивного тесту EIA, HI	так	швидко
<i>Salmonella pullorum</i>	Agg	так	повільно

Agg — аглютинація

AGP — преципітація в агаровому гелі; метод підходить, якщо випробування проводять щотижня

EIA — імуноферментний аналіз

HI — інгібування гемаглютинації

IS — імунозабарвлення

VN — нейтралізація вірусу

\*\* З відома компетентного уповноваженого органу можуть бути використані інші випробування, якщо гарантовано, що вони не менш чутливі й мають підходящу специфічність.

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

Кількість зразків для випробувань має складати не менше 10. Тестування мазків препаратів проводять через кожні 4 тижні протягом усього життя зграї з використанням не менше двох зразків досліджуваного препарату. Визначення *Salmonella spp.* у цих зразках проводять шляхом попереднього збагачення цих зразків з подальшою культивуацією на селективні для *Salmonella* середовищах.

**Випробування на антиген курячого лейкозу.** До початку періоду кладки яєць мазки клоаки та зразки крові тестують методом культивуації лейкоцитарної плівки на наявність група-специфічних антигенів лейкозу. Загалом тестують 5 % (не менше 10, але не більше 200) птахів зграї через кожні 4 тижні. Під час кладки яєць досліджують зразки білків 5 % яєць (не менше 10, але не більше 200) через кожні 4 тижні. Випробування проводять методом ЕІА на група-специфічний антиген, використовуючи методи, здатні визначати антигени з підгрупи А, В і J.

**Випробування на антитіла до інших агентів.** Випробування на антитіла до всіх агентів, наведені в Табл. 5.2.2.-1, проводять протягом періоду кладки яєць. Через кожні 4 тижні відбирають зразки у 5 % (не менше 10, але не більше 200) птахів зграї. Оскільки випробування на деякі інфекції слід проводити щотижня, рекомендується кожного тижня тестувати 1.25 % птахів зграї. Класифікація агентів за швидкістю розповсюдження серед птахів зграї і перелік агентів, які можуть бути неінфекційними для всієї зграї, наведені в Табл. 5.2.2.-1. Зразки для дослідження на агенти, що повільно розповсюджуються, тестують окремо. Для агентів, що швидко розповсюджуються, не менше 20 % зразків відбирають кожні 4 тижні та

тестують окремо. При використанні методу нейтралізації сироватки або ELISA-тесту зразки можуть досліджуватися окремо або сукупно 5 одночасно відібраних зразків.

Підхожі методи визначення агентів наведені в Табл. 5.2.2.-1. З дозволу уповноваженого органу можуть бути використані інші методи випробувань, якщо підтверджено, що вони принаймні не менш чутливі та специфічні, ніж зазначені.

### ВИПРОБУВАННЯ, ЯКІ СЛІД ПРОВОДИТИ В КІНЦІ ПЕРІОДУ КЛАДКИ ЯЄЦЬ

Після останнього збору яєць проводять завершальне дослідження, що підтверджує відсутність спадково передаваних агентів, зазначених у Табл. 5.2.2.-1. Після останнього збору яєць не менше 5 % зграї (не менше 10, але не більше 200) утримують протягом не менше 4 тижнів. Протягом 4 тижнів збирають зразки крові кожного птаха цієї групи, при цьому не менше 1.25 % птахів (25 % зразків) мають забиватися не раніше 4 тижнів після останнього збору яєць. Зразки сироватки, використовуючи зазначені методи, тестують на спадково передавані агенти (див. Табл. 5.2.2.-1). Якщо відбір зразків проводиться щотижня, не менше 1.25 % птахів (25 % зразків) тестують щотижня протягом усього цього періоду. Альтернативно протягом 4 тижнів останнього збору яєць у не менше 5 % птахів зграї відбирають кров і/або інші підхожі матеріали та тестують на наявність спадково передаваних агентів, використовуючи валідовану методику ампліфікації нуклеїнових кислот (2.6.21).

Таблиця 5.2.2.-2

#### Схематичний опис створення та утримування SPF-зграї

НОВА ГРУПА	Установлюють відсутність спадкових інфекцій
	Усіх птахів віком до 20 тижнів досліджують на антиген й антитіла до курячого лейкозу
	Проводять випробування на <i>Salmonella spp.</i> і загальне клінічне спостереження, починаючи з 8-тижневого віку
ДРУГЕ ПОКОЛІННЯ	Проводять рутинні випробування на специфічні інфекції з 20-тижневого віку
	Усіх птахів віком до 20 тижнів досліджують на антиген й антитіла до курячого лейкозу
	Проводять випробування на <i>Salmonella spp.</i> і загальне клінічне спостереження, починаючи з 8-тижневого віку
ТРЕТЄ ПОКОЛІННЯ	Проводять рутинні випробування на специфічні інфекції з 20-тижневого віку
	Усіх птахів до 20-тижневого віку досліджують на антиген й антитіла до курячого лейкозу
	Проводять випробування на <i>Salmonella spp.</i> і загальне клінічне спостереження, починаючи з 8-тижневого віку
<b>ЗГРАЇ ПРИСВОЮЮТЬ SPF-СТАТУС, ЯКЩО ВИТРИМУЮТЬСЯ ВСІ ВИПРОБУВАННЯ</b>	
ТРЕТЄ ПОКОЛІННЯ	Проводять рутинні випробування на специфічні інфекції з 20-тижневого віку
ПОДАЛЬШІ ПОКОЛІННЯ	Після кладки яєць проводять випробування на спадкові інфекції
	Досліджують у двох повторах 5 % зразків у віці від 12 до 20 тижнів на антиген до курячого лейкозу й антитіла до характерних агентів
	Проводять випробування на <i>Salmonella spp.</i> і загальне клінічне спостереження, починаючи з 8-тижневого віку
	Проводять рутинні випробування на специфічні агенти з 20-тижневого віку
	Після кладки яєць проводять випробування на спадкові інфекції

### ЗАХОДИ, ЯКИХ СЛІД УЖИВАТИ ПРИ ВИЯВЛЕННІ СПЕЦИФІЧНИХ АГЕНТІВ

При виявленні контамінації зграї агентами, що повільно розповсюджуються (наведені в Табл. 5.2.2.-1), усі матеріали, одержані зі зграї протягом 4 тижнів, безпосередньо передуючих даті виявлення позитивного зразка, вважаються незадовільної якості. При виявленні контамінації зграї агентами, що швидко розповсюджуються (наведені в Табл. 5.2.2.-1), усі матеріали, одержані зі зграї протягом 2 тижнів, безпосередньо передуючих даті виявлення позитивного зразка, так само вважаються незадовільної якості. Будь-які продукти, вироблені з використанням таких матеріалів і для яких потрібне використання SPF-матеріалів, вважаються незадовільної якості й мають бути знищені. Будь-які випробування з контролю якості, проведені з використанням таких матеріалів, вважаються недійсними.

Виробники мають якнайшвидше повідомити всім споживачам яєць про підтвердження контамінації.

Будь-яка зграя, в якій підтверджений спалах специфічної інфекції, не може далі називатися SPF-зграєю. Все потомство, отримане із цієї зграї у 4-тижневий період після або перед останнім збором негативного зразка, не може мати SPF-статусу.

#### 5.2.3. КЛІТИННІ СУБСТРАТИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИН ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Дана стаття стосується диплоїдних та безперервних клітинних ліній, використовуваних як клітинні субстрати для виробництва вакцин для застосування людиною; специфічні питання, пов'язані з вакцинами, одержаними за допомогою технології рекомбінантної ДНК, обговорюються в статті «*Продукти, одержані за допомогою технології рекомбінантної ДНК*». У Табл. 5.2.3.-1 зазначені випробування, які слід проводити на різних стадіях виробництва (посівні клітини, головний банк клітин, робочий банк клітин, клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використовувані для виробництва). Загальні положення з використання клітинних ліній і методи випробувань наведені нижче. Якщо для виробництва вакцин використовувалися первинні клітини або клітини, що пройшли декілька пасажів без закладення клітинного банку, вимоги для таких випадків наводяться в окремій статті для конкретної вакцини.

**Диплоїдні клітинні лінії.** Диплоїдні клітинні лінії здатні інтенсивно розмножуватися в умовах *in vitro* протягом обмеженого періоду часу.

**Безперервні клітинні лінії.** Безперервні клітинні лінії здатні розмножуватися довгий час в умовах *in vitro*; часто клітини можуть відрізнятися каріотипом від вихідних клітин; вони можуть бути отримані зі здорових або пухлинних тканин ссавців або комах.

Для вакцин парентерального застосування, одержаних із використанням безперервних клітинних ліній, слід валідувати процес очищення для підтвердження видалення ДНК субстратних клітин до еквівалентного рівня – не більше 10 нг на одну дозу для людини, якщо немає інших зазначень.

**Система банку клітин.** Виробництво вакцин із використанням диплоїдних і безперервних клітинних ліній засноване на системі банку клітин. Вік клітин *in vitro* відлічується від віку головного банку клітин. Кожен робочий банк клітин одержують з одного або більше контейнерів головного банку клітин. Використання, ідентичність і контроль вмісту контейнерів підлягають строгому документуванню.

**Середовища та субстанції тваринного і людського походження.** Детально записують склад середовища, використовуваного для виділення і всіх подальших культивувань. Якщо використовують субстанції людського або тваринного походження, вони мають бути вільні від сторонніх агентів (2.6.16) і витримувати вимоги статті «5.1.7. Вірусна безпека».

Використовуваний альбумін людський має відповідати вимогам статті «Альбуміну людського розчину».

Використовуваний альбумін бичачий має відповідати вимогам статті «Альбумін бичачий сироватковий».

Трипсин, використовуваний для приготування клітинних культур, досліджують відповідними методами на підтвердження стерильності та відсутності мікоплазм, вірусів, особливо пестивірусів, цирковірусів і парвовірусів.

**Посівні клітини.** Дані, використовувані для оцінки придатності посівних клітин, по можливості, мають містити інформацію про їх джерело, історію та характеристики.

**Джерело посівних клітин.** Для клітинних ліній людського походження інформація про донора має містити таке: етнічне та географічне походження, вік, стать, загальний фізіологічний стан, або використаний орган або тканина, результати всіх тестів на патогени.

Для клітинних ліній тваринного походження інформація про джерело клітин має містити таке: вид, штам, умови вирощування, географічне походження, вік, стать, загальний фізіологічний стан, або використаний орган або тканина, результати всіх тестів на патогени.

Клітини нервової тканини, такі як нейробластома та P12 клітинні лінії, можуть містити речовини, що є переносниками губчастої енцефалопатії. Такі клітини не слід використовувати у виробництві вакцин.

**Історія посівних клітин.** Записують наступну інформацію: метод, використаний для виділення посівних клітин; методи культивування і будь-яких інших процедур із закладення головного банку клітин, осо-

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

бливо ті, які можуть спровокувати появу сторонніх агентів.

Повна інформація про використані у минулому компоненти середовища культивування клітин може бути недоступна, наприклад про джерело речовин тваринного походження; в обґрунтованих і виправданих випадках при виробництві вакцин можуть бути використані вже закладені банки клітин із такими середовищами.

**Характеристики посівних клітин.** Досліджуються такі властивості:

- (1) ідентичність клітин (наприклад, ізоферменти, серологічні властивості, «відбитки пальців» нуклеїнових кислот);
- (2) характеристики зростання клітин і їх морфологічні властивості (оптична та електронна мікроскопія);

- (3) каріотип для диплоїдних клітинних ліній;
- (4) тривалість життя *in vitro*, виходячи з рівня подвоєння популяції для диплоїдних клітинних ліній.

**Стабільність клітинних субстратів.** Слід продемонструвати відповідну життєздатність клітинних ліній у передбачуваних умовах зберігання. Для даного продукту, що отримується на клітинній лінії, необхідно показати відтворюваність виробництва як в початкових рівнях пасажів, так і в кінці зазначеної тривалості життя клітин.

**Сторонні інфекційні агенти.** Клітинні лінії для виробництва вакцин мають бути вільні від сторонніх інфекційних агентів. Проводять випробування на сторонні агенти, зазначені в Табл. 5.2.3.-1, використовуючи наведені нижче методи.

Таблиця 5.2.3.-1

### Випробування клітинних ліній

Випробування	Посівні клітини	Головний банк клітин (ГБК, МСВ)	Робочий банк клітин (РБК, WCB)	Клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві
<b>1. ІДЕНТИЧНІСТЬ І ЧИСТОТА</b>				
Морфологічні	+	+	+	+
Ідентифікація: аналіз «відбитків пальців» нуклеїнових кислот та вибір найважливіших підходящих випробувань, наведених нижче: біохімічні (наприклад, ізоферментний аналіз), імунологічні (наприклад, гістосумісність), цитогенетичні маркери	+	+	+	+
Каріотип (диплоїдні клітинні лінії)	+	+	+(1)	+(1)
Тривалість життя (диплоїдні клітинні лінії)	—	—	+	—
<b>2. СТОРОННІ АГЕНТИ</b>				
Відсутність бактерій та грибів	—	+	+	—
Мікоплазми	—	+	+	—
Спіроплазми (клітинні лінії комах)	—	+	+	—
Електронна мікроскопія (клітинні лінії комах)	—	+(3)	—	+(3)
Випробування на сторонні агенти в культурі клітин				
Сумісне культивування	—	—	+(2)	+(2)
Випробування на тваринах і яйцях	—	—	+(2)	+(2)
Специфічні випробування на можливі контамінанти залежно від джерела клітин	—	—	+(2)	+(2)
Ретровіруси	—	+(3)	—	+(3)
<b>3. КАНЦЕРОГЕННІСТЬ</b>				
Канцерогенність	+(5)	—	—	+(4)

(1) Диплоїдність установлюють для кожного робочого банку клітин, але використовуючи клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві.

(2) Випробування проводять для кожного робочого банку клітин, але використовуючи клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві.

(3) Випробування проводять для головного банку клітин, але використовуючи клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві.

(4) Клітинні лінії MRC—5, WI—38 і FRhL—2 визнані неканцерогенними і можуть не тестуватися. Випробування також проводять для клітинних ліній з відомою або передбачуваною канцерогенною активністю, наприклад CHO і ВНК-21.

(5) Випробування проводять для посівних клітин, але використовують клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві.

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

Для клітинних ліній, одержаних із комах, проводять випробування на суттєві видоспецифічні віруси клітин комах та на арбовіруси (arthropod-borne virus). Панель випробовуваних вірусів вибирають, виходячи з сучасних наукових даних.

Клітинні лінії, в яких виявлена присутність здатних до реплікації ретровірусів, не можуть бути використані для виробництва вакцин.

**Канцерогенність.** У виробництві препаратів живих вакцин не можуть використовуватися клітинні лінії, які можуть бути канцерогенними на будь-якому рівні подвоєння популяції. Якщо для виробництва деяких типів вакцин використовують канцерогенні клітини, слід валідувати процеси очищення і показати, що залишковий вміст ДНК субстратних клітин знижений до менше 10 нг на одну дозу вакцини для людини, якщо немає інших зазначень, і що вміст білків субстратних клітин зменшений до прийнятого рівня.

Якщо відомо, що клітинна лінія має канцерогенну активність, її подальше тестування не проводять. Якщо не відомо про канцерогенну активність клітинної лінії, її розглядають як канцерогенну або тестують на канцерогенність *in vivo* з використанням одного з наведених нижче методів або *in vitro*, якщо необхідна додаткова інформація. Випробування проводять, використовуючи клітини на рівні або вище максимального рівня подвоєння популяції, використаного при виробництві вакцин.

MRC-5, WI-38 і FRhL-2 клітинні лінії визнані неканцерогенними і можуть не піддаватися подальшим дослідженням.

**Характеристика хромосом.** Слід підтвердити, що диплоїдні клітинні лінії диплоїдні. Якщо видалення інтактних клітин у процесі обробки після збору не валідовано, слід провести всебічний аналіз каріотипу диплоїдних клітинних ліній. Досліджують зразки чотирьох рівномірних інтервалів життєвого відрізка пасажів клітинних ліній. Досліджують не менше 200 клітин у метафазі для точного підрахунку хромосом і для виявлення частоти гіпер-, гіпо- і поліплоїдії, розривів і структурних аномалій.

MRC-5, WI-38 і FRhL-2 клітинні лінії добре охарактеризовані та визнані диплоїдними; якщо вони генетично не модифіковані, не вимагається подальших досліджень.

### МЕТОДИ ВИПРОБУВАНЬ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ

**Морфологія.** Адекватно описують і документують морфологію клітин.

**Ідентифікація.** Достовірність клітин можна встановити аналізом «відбитків пальців» нуклеїнових кислот і вибором відповідних характеристик, наведених нижче:

- (1) біохімічні характеристики (ізоферментний аналіз);
- (2) імунологічні характеристики (гістосумісність антигенів);
- (3) цитогенетичні маркери.

**Контамінуючі клітини.** Аналіз «відбитків пальців» нуклеїнових кислот, проведений при ідентифікації, також може служити для демонстрації відсутності контамінуючих клітин.

**Відсутність бактерій та грибів.** Головний і кожен робочий банки клітин мають витримувати випробування на стерильність (2.6.1) із використанням 10 мл надосадової рідини клітинних культур для кожного середовища. Випробування проводять із використанням 1 % контейнерів, але не менше двох контейнерів.

**Мікоплазми (2.6.7).** Головний банк і кожен робочий банки клітин мають витримувати випробування на мікоплазми. Випробування проводять, використовуючи один або більше контейнерів.

**Спіроплазми (клітинні лінії комах).** Головний і кожен робочий банки клітин комах мають бути вільні від спіроплазм, що підтверджують проведенням затверджених компетентним уповноваженим органом валідованих методів.

**Електронна мікроскопія (клітинні лінії комах).** Головний банк клітин електронним мікроскопом досліджують на наявність випадкових агентів. Клітинні лінії витримують при регулярно використовуваний при виробництві температурі і беруть клітини на рівні або вище рівня подвоєння популяції. Крім того, клітинні лінії витримують при температурі вище й нижче регулярно використовуваної при виробництві і також можуть бути піддані таким діям, як хімічні стрес-фактори. З компетентним уповноваженим органом погоджують використані температури культивування та обробки, а також кількість відібраних клітин для досліджень.

**Випробування на сторонні агенти в культурі клітин.** Клітини мають витримувати випробування на гемоадсорбуючі віруси та інші сторонні інфекції, наведені в статті (2.6.16) в розділі «Виробнича культура клітин: контрольні клітини». Якщо клітини одержані від мавп, їх також інокулюють у кролячу ниркову клітинну культуру для випробування на вірус герпесу В (вірус герпесу 1 *cercopithecine*).

**Сумісне культивування.** Для клітинних ліній ссавців і птахів сумісно культивують з іншими клітинними системами (включаючи клітини людини та мавп) нарізно інтактні й/або зруйновані клітини. Для клітинних ліній комах екстракти зруйнованих клітин інкубують з іншими клітинними системами, включаючи клітини людини та мавп, та принаймні однією клітинною лінією, що відрізняється від використовуваної при виробництві, придатна для ви-

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

русів комах і дозволяє виявити людські арбовіруси (наприклад, ВНК-21). Проводять випробування для визначення можливих морфологічних змін. Досліджують клітинні культуральні рідини для виявлення вірусів гемаглютинації або клітини для виявлення гемадсорбуючих вірусів. Для виявлення арбовірусів у клітинах комах не проводять випробування на віруси гемаглютинації. Клітини витримують випробування, якщо не виявлені будь-які сторонні агенти.

**Ретровіруси.** Досліджують на наявність ретровірусів, використовуючи:

- (1) кількісне визначення за допомогою посиленої продуктом зворотної транскриптази (PERT) (2.6.21), проведене на надосадовій рідині банку клітин на рівні або вище рівня максимального подвоєння популяції, використовуюваного при виробництві;
- (2) трансмісійну електронну мікроскопію.

Якщо тести (1) і (2) дають позитивні результати, проводять тест (3):

- (3) визначення інфекційності проводять на людських клітинах з кінцевою точкою PERT-визначенням на надосадовій рідині.

**Випробування на тваринах.** Лабораторним тваринам внутрішньом'язово (або підшкірно новонародженим мишам) вводять життєздатні клітини у концентрації  $10^7$ , розділені нарівно між тваринами кожної групи:

- (1) 2 приплоди новонароджених (не пізніше ніж через 24 год після народження) мишей, але не менше 10 особин;
- (2) 10 дорослих мишей.

Для виявлення лімфоцитних хориоменінгітних вірусів 10 дорослим мишам інтрацеребрально вводять життєздатні клітини в концентрації  $10^6$ .

Тварин спостерігають протягом не менше 4 тижнів. Досліджують хворих або виявляючих аномальні ознаки тварин для виявлення причини захворювання. Клітини витримують випробування, якщо не виявлена присутність будь-яких сторонніх агентів. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % тварин кожної групи залишаються здоровими і виживають до кінця періоду спостереження.

**Випробування на яйцях.** У алантоїсну порожнину 9—11-денних ембріонів 10 SPF-курячих яєць (5.2.2) і в жовтковий мішечок 5—6-денних ембріонів 10 SPF-курячих яєць вводять по  $10^6$  життєздатних клітин. Інкують протягом не менше 5 діб. Алантоїсну рідину тестують на наявність гемаглютининів, використовуючи еритроцити ссавців і птахів; випробування проводять при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  і  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  і реєструють результат через 30-60 хв. Клітини витримують випробування, якщо не підтверджена наявність сторонніх агентів. Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше 80 % ембріонів залишаються здоровими та виживають до кінця періоду спостереження.

**Специфічні тести на можливі контамінанти залежно від джерела клітин.** Проводять випробування на специфічні патогени, використовуючи метод ампліфікації нуклеїнових кислот (МАНК, NAT) (2.6.21) з попередньою або без ампліфікацією в клітинах. Альтернативно можуть застосовуватися відповідні серологічні методи, такі як імуоферментний аналіз, тести з нейтралізації сироваткою й утворення антитіл у відповідних дозволених тваринах. Для клітинних ліній, одержаних від гризунів, використовують або тест утворення антитіл у мишей, шурів або хом'яків, або МАНК (2.6.21) для виявлення видоспецифічних вірусів. Слід урахувати походження та історію культивування клітинних ліній. Розробляють випробування, що дозволяють виявляти потенційні забруднення, особливо ті, які відомі як латентні інфекції для вихідних видів, наприклад вірус 40 мавп у резус-позитивних мавп або Floch house virus клітин комах.

**Випробування на канцерогенність *in vivo*.** Випробування полягає у проведенні порівняння між клітинною лінією й відповідними позитивними клітинами порівняння (наприклад, із клітинами HeLa або Her2c).

Підходими для таких випробувань тваринами є:

- (1) атимічні миші (Nu/Nu генотип);
- (2) новонароджені миші, шури або хом'яки, що пройшли обробку антитимоцитною сироваткою або глобуліном;
- (3) тимусектомізовані миші, опромінені й відновлені (Т, В+) кістковим мозком здорових мишей.

Як б не вибиралася група тварин, у кожен окрему групу з 10 тварин вводять клітинні лінії і клітини порівняння. В обох випадках інокулят для кожної тварини складає  $10^7$  суспендованих клітин в об'ємі 0.2 мл, який вводять або внутрішньом'язовим, або підшкірним способом. Новонародженим тваринам вводять по 0.1 мл антитимоцитної сироватки або глобуліна на 0, 2, 7 і 14 добу після народження. За ефективну сироватку або глобулін вважається препарат, який пригнічує імунні механізми зростаючих тварин так, що подальша інокуляція  $10^7$  позитивних клітин порівняння регулярно викликає утворення пухлин і метастазів. Важко уражених тварин, у яких спостерігається явно прогресивне пухлинне зростання, усипляють до завершення випробування, уникаючи непотрібного страждання тварин.

У кінці періоду спостереження всіх тварин, включно з групою (групами) порівняння, усипляють та досліджують на макро- і мікроскопічний доказ проліферації інокульованих клітин у ділянці ін'єкції і в інших органах (наприклад, лімфатичні вузли, легені, нирки і печінка).

У всіх випробуваннях тварин спостерігають та оглядають через певні інтервали для виявлення утворень у ділянці ін'єкції. Будь-які утворення вимірюють в 2 перпендикулярних напрямках, постійно записуючи вимірювання для виявлення прогресуючого росту

утворень. Тварин, в яких у період спостереження було виявлено утворення, що регресує, усипляють до моменту повного зникнення вузлика та проводять гістологічне дослідження. Тварин із прогресуючим ростом вузликів спостерігають протягом 1-2 тижнів. Половину тварин без утворень спостерігають протягом 3 тижнів, останніх – протягом 12 тижнів до моменту евтаназії та гістологічних досліджень. Проводять аутопсію кожної тварини та досліджують макроскопічні докази утворення пухлини в ділянці ін'єкції та інших органах, таких як лімфатичні вузли, легені, мозок, селезінка, нирки і печінка. Гістологічному дослідженню піддають усі пухлинноподібні ураження і ділянку ін'єкції. Більш того, оскільки деякі клітинні лінії можуть привести до появи метастазів без доказів місцевого пухлинного росту, гістологічному дослідженню піддають будь-які місцеві лімфатичні вузлики, що виявляються, і легені всіх тварин.

Результати випробування вважаються вірогідними, якщо не менше як у 9 з 10 тварин, яким вводили позитивні клітини порівняння, виявляється прогресуюче зростання пухлини.

**Випробування на канцерогенність *in vitro*.** Можуть використовуватися такі системи випробування:

- (1) утворення колоній у м'яких агарових гелях;
- (2) отримання інвазивного клітинного росту після інокуляції культури в органи;
- (3) дослідження трансформуючої активності, використовуючи, наприклад, ЗТЗ систему аналізу для активних онкогенів.

#### 5.2.4. КУЛЬТУРИ КЛІТИН ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИН ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

Культури клітин для виробництва вакцин для застосування у ветеринарії мають витримувати вимоги цієї статті. Усім або деяким вимогам цієї статті в необхідних випадках також мають відповідати культури клітин, використовувані для випробування вакцин для застосування у ветеринарії.

Більшість вірусів ссавців можуть розмножуватися у клітинних лініях, і повторне використання первинних клітин не допускається.

Постійно інфіковані клітини, використовувані для виробництва вакцин для застосування у ветеринарії, мають витримувати вимоги, наведені нижче. Слід показати, що клітини інфіковані лише зазначеним агентом.

#### КЛІТИННІ ЛІНІЇ

Звичайно із клітинними лініями поводяться відповідно до системи посівної серії. Головним посівним клітинам надають спеціальний ідентифікаційний код. Головні посівні клітини зберігають у вигляді аліквот при температурі -70 °С або нижче. Звичайно

у виробництві вакцин використовують клітини, що пройшли не більше 20 пасажів від головної посівної серії. Якщо використовують суспензію культур, збільшення кількості клітин, приблизно еквівалентне подвоєнню трьох поколінь, вважається еквівалентним одному пасажу. Якщо у виробництві мають використовуватися клітини після 20 рівня пасажу, шляхом валідації або іншими випробуваннями слід показати, що виробнича культура клітин по суті аналогічна з головними посівними клітинами в плані біологічних характеристик і чистоти, застосування таких клітин негативно не впливає на виробництво вакцин.

Має бути відома історія клітинної лінії та детально задокументована (наприклад, походження, кількість пасажів і використовувані в розмноженні живильні середовища, умови зберігання).

Записують спосіб зберігання і використання клітин, включаючи подробиці: як гарантувати неперевищення дозволеної кількості пасажів у виробництві. Для аналітичних цілей зберігають необхідну кількість головних і робочих посівних клітин.

Випробування, наведені нижче, проводять (як зазначено в Табл. 5.2.4-1) на культурі головних посівних клітин, робочих посівних клітин або на культурі клітин, одержаній із робочих посівних клітин на найвищому рівні пасажу, використаному у виробництві, яка отримана з підтвердженого гомогенного репрезентативного зразка.

**Характеристики культур.** Описують зовнішній вигляд клітинного моношару до і після гістологічного забарвлення. Наводять інформацію, якщо можливо, числові показники, зокрема швидкості та ступеня зростання. Також зазначають наявність або відсутність контактних інгібіторів, багатоядерних клітин і будь-яких інших аномалій.

**Каріотип.** Проводять дослідження хромосом не менше 50 клітин на стадії мітозу з головних посівних клітин на рівні пасажу щонайменше не нижчому за той, що використовується у виробництві. Будь-який хромосомний маркер, присутній в головних посівних клітинах, також має виявлятися в клітинах вищих пасажів, і модальна кількість хромосом у цих клітинах може перевищувати їхню кількість у головних посівних клітинах не більше як на 15 %. Каріотипи мають бути ідентичними. Якщо модальна кількість перевищує зазначену межу або в робочих посівних клітинах на найвищому рівні пасажу, використаному у виробництві, не виявляються хромосомні маркери або відрізняється каріотип, ці клітинні лінії не мають використовуватися у виробництві.

**Ідентифікація видів.** Валідованим методом слід показати, що головні посівні клітини та клітини робочих посівних клітин на найвищому рівні виробничого пасажу відповідають зазначеним вихідним видам. Якщо при проведенні флуоресцентного випробу-



## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

вання із використанням відповідної вихідному виду клітин сироватки показано, що всі випробовувані клітини – флуоресцентні, немає необхідності проводити інші випробування з реактивами, здатними визначити забруднення клітинами інших видів.

Таблиця 5.2.4.-1

Стадія культури клітин, на якій слід проводити випробування

	Головні посівні клітини	Робочі посівні клітини	Клітини з робочих посівних клітин на найвищому рівні пасажу
Загальна мікроскопія	+	+	+
Бактерії та гриби	+	+	—
Мікоплазми	+	+	—
Віруси	+	+	—
Ідентифікація видів	+	—	+
Каріотип	+	—	+
Канцерогенність	+	—	—

**Відсутність бактерій та грибів.** Клітини мають витримувати випробування на стерильність (2.6.1). У випробовуваному зразку кількість клітин має бути не менше кількості, що створює моношар із площею 70 см<sup>2</sup>, або для вирощених у суспензіях клітин — еквівалентна цій кількості клітин. Перед проведенням випробування клітини протягом не менше 15 діб культивують без антибіотиків.

**Мікоплазми (2.6.7).** Клітини мають витримувати випробування на мікоплазми. Перед проведенням випробування клітини культивують без антибіотиків не менше 15 діб.

**Відсутність контамінуючих вірусів.** Клітини не мають бути забруднені вірусами; проводять підхожі чутливі випробування, із зазначеними нижче включно.

Випробовувані моношари повинні мати площу не менше 70 см<sup>2</sup>, мають бути приготовані та культивовані з використанням тих самих середовищ і добавок, вирощені у тих самих умовах, що і клітини, які використовуються у виробництві вакцин. Клітини культивують загалом не менше 28 діб. Субкультуру готують 7-добовими інтервалами, поки клітини виживають протягом цього терміну, тоді субкультуру готують на найостанніший можливий день. Для кінцевої субкультури готують необхідну кількість клітин у підхожих контейнерах для проведення зазначених нижче випробувань.

Моношари протягом усього періоду інкубації регулярно обстежують для виявлення можливих цитопатичних ефектів і у кінці періоду спостереження на цитопатичні ефекти імунофлуоресценцією або іншими підхожими випробуваннями, зазначеними нижче, досліджують гемоадсорбуючі віруси та інші специфічні віруси.

**Виявлення цитопатичних вірусів.** Підхожим цитологічним барвником забарвлюють два моношари, площа кожного з яких не менше 6 см<sup>2</sup>. Усю площу кожного забарвленого моношару досліджують на будь-які включення, аномальну кількість великих клітин або будь-які інші ураження, що свідчать про клітинні аномалії, властиві забрудненням.

**Виявлення гемоадсорбуючих вірусів.** Моношари загальною площею не менше 70 см<sup>2</sup> кілька разів промивають підхожим буферним розчином і додають достатній об'єм суспензії підхожих еритроцитів для рівномірного покриття площі моношару. Після різного інкубаційного періоду клітини досліджують на наявність гемоадсорбції.

**Виявлення специфічних вірусів.** Проводять випробування на наявність специфічних контамінантів для вихідних видів клітинних ліній і видів, для яких призначений продукт.

На підхожих підкладках готують необхідну кількість клітин для проведення випробувань на специфічні агенти. У кожне випробування включають підхожі позитивні контролі. Клітини піддають підхожим випробуванням, наприклад використовуючи кон'юговані з флуоресцеїном антитіла або аналогічні реактиви.

**Випробування в інших культурах клітин.** Необхідні моношари, загальна площа яких не менше 140 см<sup>2</sup>. Клітини не менше трьох разів заморожують і розморожують, потім центрифугують для видалення залишків клітин. Аліквоти інокулюють у будь-який час у наступні клітини для отримання більше 70 % злиття:

- первинні клітини вихідних видів;
- клітини, чутливі до вірусів, патогенних для видів, для яких призначена вакцина;
- клітини, чутливі до пестивірусів.

Інокульовані клітини культивують протягом не менше 7 діб, потім готують екстракти, як наведено вище, заморожуванням-розморожуванням й інокулюють у свіжі культури клітин цього самого виду для проведення наведеного нижче випробування. Клітини інкубують ще не менше 7 діб. Культури регулярно досліджують на наявність будь-яких цитопатичних змін, характерних для живих організмів.

У кінці цього 14-добового періоду інокульовані клітини піддають перевіркам на:

- відсутність цитопатичних і гемоадсорбуючих організмів, використовуючи методи, зазначені вище у відповідних розділах;
- відсутність пестивірусів та інших специфічних контамінантів імунофлуоресценцією або іншими валідованими методами, як зазначено вище в розділі «Виявлення специфічних вірусів».

**Канцерогенність.** Слід оцінити ризик для видів-мішеней, що походять від клітинної лінії, і, якщо необхідно, провести випробування.

## ПЕРВИННІ КЛІТИНИ

Для більшості вакцин для ссавців застосування для виробництва первинних клітин не прийнятне, тому можуть бути використані клітинні лінії. Якщо немає альтернативи застосуванню первинних клітин, їх отримують зі стада або зграї, вільних від специфічних патогенів, забезпечуючи повний захист від занесення захворювань (наприклад, встановлюючи бар'єр до хвороб, фільтри на надходження повітря, відповідні карантинні заходи перед введенням тварин до стада/зграї). Курячі зграї мають витримувати вимоги статті «5.2.2. Курячі зграї, вільні від специфічних патогенів, для виробництва та контролю якості вакцин». Для решти видів слід показати, що стадо або зграя вільні від істотних специфічних патогенів. Всі джерела кормів стада або зграї, використовуваних в приготуванні первинних клітин для виробництва вакцин, є об'єктом відповідних моніторингових процедур. Вони включають регулярні серологічні перевірки, що проводяться не рідше двох разів на рік, і два додаткових дослідження, що проводяться на 15 % запасу корму в зграї між зазначеними вище двома перевірками.

Там, де можливо, особливо для клітин ссавців, використовують систему посівної серії, наприклад з головними посівними клітинами, утвореними після менше 5 пасажів, робочими посівними клітинами, що пройшли не більше 5 пасажів від початкових препаратів клітинної суспензії від тваринних тканин.

Кожну серію головних посівних клітин, робочих посівних клітин і клітин найвищого рівня пасажу первинних клітин перевіряють відповідно до Табл. 5.2.4.-2 і методик, наведених нижче. Випробовувані зразки мають покривати всі джерела клітин, використаних для виробництва партії. Жодна партія вакцини, вироблена з використанням клітин, для яких у процесі перевірки одержані незадовільні результати, не може бути випущена для застосування.

Таблиця 5.2.4.-2  
Стадія культури клітин, на якій слід проводити випробування

	Головні посівні клітини	Робочі посівні клітини	Клітини найвищого рівня пасажу
Загальна мікроскопія	+	+	+
Бактерії та гриби	+	+	—
Мікоплазми	+	+	—
Віруси	+	+	—
Ідентифікація видів	+	—	+

**Характеристики культур.** Описують зовнішній вигляд клітинного моношару до і після гістологічного забарвлення. Записують, якщо можливо, інформацію відносно числових показників, особливо швидкості та рівня росту. Також зазначають наявність або відсутність контактних інгібіторів, багатоядерних клітин і будь-яких специфікованих клітинних аномалій.

**Ідентифікація видів.** Валідованим методом слід показати, що головні посівні клітини та клітини робочих посівних клітин мають те саме походження, що зазначене для вихідних видів.

Якщо при проведенні флуоресцентного випробування з використанням відповідної вихідному виду клітин сироватки показано, що всі випробовувані клітини флуоресцентні, немає необхідності проводити інші випробування з реактивами, здатними визначити забруднення клітинами інших видів.

**Відсутність бактерій та грибів.** Клітини мають витримувати випробування на стерильність (2.6.1). У випробовуваному зразку кількість клітин має бути не менше кількості, що створює моношар із площею 70 см<sup>2</sup>, або для вирощених у суспензіях клітин — еквівалентна цій кількості клітин. Перед проведенням випробування клітини без антибіотиків культивують протягом не менше 15 діб.

**Мікоплазми (2.6.7).** Клітини мають витримувати випробування на мікоплазми. Перед проведенням випробування клітини культивують без антибіотиків протягом не менше 15 діб.

**Відсутність контамінуючих вірусів.** Клітини не мають бути забруднені вірусами; проводять підходячі чутливі випробування, включаючи зазначені нижче.

Випробовувані моношари повинні мати площу не менше 70 см<sup>2</sup>, мають бути приготовані та культивовані з використанням тих самих середовищ і добавок, вирощені у тих самих умовах, що і клітини, які використовують у виробництві вакцин.

Моношари культивують загалом не менше 28 діб або найбільш тривалий можливий період, якщо не можливе культивування протягом 28 діб. Субкультуру готують 7-добовими інтервалами, поки клітини виживають протягом цього терміну, далі субкультуру готують на найостанніший можливий день. Для кінцевої субкультури готують необхідну кількість клітин у підходящих контейнерах для проведення зазначених нижче випробувань.

Моношари протягом усього періоду інкубації регулярно обстежують для виявлення можливих цитопатичних ефектів і в кінці періоду спостереження імунофлуоресценцією або іншими підходящими випробуваннями, наведеними нижче, досліджують на цитопатичні ефекти, віруси гемадсорбції і специфічні віруси.

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

**Виявлення цитопатичних вірусів.** Підходящим цитологічним барвником забарвлюють два моношари, площа кожного з яких не менше 6 см<sup>2</sup>. Усю площу кожного забарвленого моношару досліджують на будь-які включення, аномальну кількість великих клітин або будь-які інші ураження, що свідчать про клітинні аномалії, властиві забрудненням.

**Виявлення гемоадсорбуючих вірусів.** Моношари загальною площею не менше 70 см<sup>2</sup> кілька разів промивають підходящим буферним розчином і додають достатній об'єм суспензії підходящих еритроцитів для рівномірного покриття площі моношару. Після різного інкубаційного періоду клітини досліджують на наявність гемоадсорбції.

**Виявлення специфічних вірусів.** Проводять випробування на наявність специфічних контамінантів для вихідних видів клітинних ліній і видів, для яких призначений продукт.

На підходящих підкладках готують необхідну кількість клітин для проведення випробувань на специфічні агенти. У кожне випробування включають підходящі позитивні контролю. Клітини піддають підходящим випробуванням, наприклад використовуючи кон'юговані з флуоресцеїном антитіла або аналогічні реактиви.

**Випробування в інших культурах клітин.** Необхідні моношари, загальна площа яких не менше 140 см<sup>2</sup>. Клітини не менше трьох разів заморожують і розморожують, потім центрифугують для видалення залишків клітин. Аліквоти інокулюють у будь-який час у наступні клітини для отримання 70 % злиття:

- первинні клітини вихідних видів;
- клітини, чутливі до вірусів, патогенних для видів, для яких призначена вакцина;
- клітини, чутливі до пестивірусів.

Інокульовані клітини культивують протягом не менше 7 діб, потім, як наведено вище, готують екстракти заморожуванням-розморожуванням й інокулюють у свіжі культури клітин цього самого виду для проведення наведеного нижче випробування. Клітини інкубують ще не менше 7 діб. Культури регулярно досліджують на наявність будь-яких цитопатичних змін, характерних для живих організмів.

У кінці цього 14-добового періоду інокульовані клітини піддають перевіркам на:

- відсутність цитопатичних і гемоадсорбуючих організмів, використовуючи методи, зазначені вище у відповідних розділах;
- відсутність пестивірусів і інших специфічних контамінантів імунофлуоресценцією або іншими валідованими методами, як зазначено вище в розділі «Виявлення специфічних вірусів».

### 5.2.5. СУБСТАНЦІЇ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ІМУНОЛОГІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

#### 1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Субстанції тваринного походження (наприклад, сироватка, трипсин і альбумін сироватковий) можуть бути використані в процесі виробництва імунологічних лікарських засобів для застосування у ветеринарії.

Вимоги, наведені в цій статті, стосуються субстанцій тваринного походження, виготовлених партією для застосування на всіх стадіях виробництва, наприклад у середовищі для культивування або як додані інгредієнти продуктів у процесі змішування. Ці вимоги не призначені для контролю посівних серій або субстратів тваринного походження, вимоги до яких наведені в інших статтях, наприклад «*Вакцини для застосування у ветеринарії*» і «*5.2.4. Культури клітин для виробництва вакцин для застосування у ветеринарії*».

#### 2. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ ТА ВИМОГИ

*Субстанції тваринного походження мають витримувати вимоги Фармакопеї (якщо є відповідні статті).*

Слід обмежити застосування субстанцій тваринного походження з міркувань безпеки — через наявність у них можливих патогенів, а також з епідеміологічних і/або регуляторних вимог, пов'язаних із присутністю в них специфічних антигенів (або живих, або інактивованих).

Загальні положення:

- рекомендується, де можливо, мінімізувати застосування субстанцій тваринного походження;
- якщо немає інших зазначень, застосування субстанцій тваринного походження як компонентів лікарських засобів не допускається, окрім тих випадків, коли такі субстанції піддаються валідованим процесам обробки з інактивації живих сторонніх агентів.

Загальні вимоги:

- будь-яка партія субстанції (після інактивації і/або обробки, де застосовно) при виявленні в ній або при ймовірності вмісту будь-яких живих сторонніх агентів має бути знищена або використана лише у виняткових і обґрунтованих випадках: для застосування такої субстанції слід провести подальшу обробку, яка забезпечить видалення і/або інактивацію сторонніх агентів, і потім слід підтвердити задовільність проведених процедур;
- будь-яка партія субстанції, яка після оцінки ризиків визнана здатною спричинити імунну від-

повідь у видах-мішенях через забруднення інактивованими сторонніми агентами, не має бути використана у виробництві даного специфічного ветеринарного імунологічного препарату.

### 3. УПРАВЛІННЯ РИЗИКАМИ

Жоден захід або комбінація заходів не може гарантувати безпеку використання субстанцій тваринного походження, але вони можуть зменшити ризик їх використання. Отже, виробникам ветеринарних імунологічних препаратів необхідно врахувати це при виборі для виробництва субстанцій тваринного походження і проводити оцінку ризику з урахуванням їх джерела і використаних технологічних стадій.

Крім того, слід використовувати процедури з управління ризиками. Будь-який залишковий ризик має бути оцінений з погляду потенційної користі від застосування субстанції у виробництві ветеринарних імунологічних препаратів.

#### 3-1. ОЦІНКА РИЗИКУ

При оцінці ризику слід взяти до уваги захворювання тварин, що спостерігалися в країнах-джерелах використовуваних як субстанції тварин, потенційні інфекційні захворювання вихідних видів і можливу інфекційність у вихідних тканинах і органах. Як частину оцінки ризику з цієї інформації можна скласти перелік сторонніх агентів, які можуть бути присутні в субстанції.

Слід оцінити ризик забруднення субстанцій і згодом ветеринарних імунологічних препаратів живими сторонніми агентами. Слід також врахувати ризик забруднення субстанції та згодом ветеринарних імунологічних препаратів інактивованими сторонніми агентами. Це може бути в тому разі, якщо, наприклад, забруднення належить до тих, від яких Європа офіційно вважається вільною, і/або є об'єктом програми контролю специфічного захворювання у європейських країнах і де наявність інактивованого агента може призвести до стимуляції явної імунної відповіді у тварин-реципієнтів.

Як частину оцінки ризику слід взяти до уваги наявність у субстанції антитіл, здатних вплинути на визначення і/або інактивацію живих сторонніх агентів.

Повторна оцінка ризику, повторне визначення і перегляд наведених нижче кроків з управління ризиками можуть знадобитися для врахування змін:

- у разі появи в країні або країнах, звідки одержані використані як джерело субстанцій тварини, захворювань, включаючи захворювання, що тільки з'явилися (нові патогени);
- у разі захворювань і заходів із контролю захворювань, застосованих у європейських країнах, в

яких використовується вироблений із субстанції ветеринарний імунологічний препарат.

#### 3-2. КОНТРОЛЬ РИЗИКІВ

Для кожного потенційного стороннього агента, ідентифікованого при оцінці ризику, з урахуванням передбачуваного застосування субстанції слід проконтролювати ризик, використовуючи один або комбінацію наведених нижче заходів:

- установлювати обмеження щодо джерела матеріалу та проводити аудит;
- використовувати валідовану процедуру інактивації;
- підтверджувати здатність технологічного процесу видаляти або інактивувати сторонні агенти;
- проводити випробування на сторонні агенти.

### 4. КОНТРОЛЬНІ ЗАХОДИ

#### 4-1. ДЖЕРЕЛА

Усі субстанції тваринного походження (включаючи суміші), використовувані у виробництві ветеринарних імунологічних препаратів, слід отримувати з відомих і документованих джерел (включаючи вихідні види та країни, тваринну сировину та тканини).

#### 4-2. ПРИГОТУВАННЯ

Субстанції тваринного походження готують із гомогенної маси з наданим номером партії. Партія може містити субстанції, отримані з будь-якої кількості тварин, яку було чітко визначено, був наданий номер, і до неї вже нічого не додають або не забруднюють іншим шляхом.

Використовуваний спосіб виробництва субстанцій тваринного походження з сировини має сприяти видаленню і/або інактивації сторонніх агентів (див. розділ 4.3).

#### 4-3. ІНАКТИВАЦІЯ І/АБО ІНШІ СТАДІЇ ОБРОБКИ З ВИДАЛЕННЯ СТОРОННІХ АГЕНТІВ

Процедура інактивації і/або інші вибрані стадії обробки мають бути валідовані, і слід показати, що вони здатні в даній субстанції зменшити титр наведених нижче потенційних сторонніх агентів на не менше  $10^6$ . Якщо таке зменшення титру неможливо продемонструвати експериментально, слід установити максимальний титр переробки стороннього агента з урахуванням зниження титру завдяки інактивації/стадії обробки та включаючи нижню межу безпеки — 100; для кожної партії субстанцій необхідно визначати початковий титр переробки і підтверджувати, що він не перевищує встановлену межу, доки не проведена належна, обґрунтована на вірогідних і підхожих результатах оцінка ризику, під-

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

тверджуюча, що титр завжди буде в 100 разів нижче титру, який може бути ефективно інактивованим.

Валідацію методик проводять, використовуючи підходящий репрезентативний ряд вірусів, включаючи різні типи і розміри (вкриті і неvkриті, з ДНК і РНК, одно- і двониткові, термо- і рН-стійкі), включаючи випробовувані віруси з різним ступенем стійкості, з урахуванням типу використовуваного методу/методів і вірусів, які можуть бути присутні в матеріалі. Доказ ефективності методик може мати форму посилення на опубліковану літературу і/або експериментальні дані, накопичені виробником, але вони мають бути значущі для умов виробництва й інактивації/обробки субстанцій.

Для інактивованих ветеринарних імунологічних препаратів використаний метод інактивації активного інгредієнта також може бути валідований для інактивації можливих забруднень субстанцій тваринного походження, використаних для виробництва даного активного інгредієнта.

### 4-4. ВИПРОБУВАННЯ

Залежно від результатів оцінки ризику і наявних результатів валідації використаної методики можуть бути проведені випробування на сторонні агенти на кожній партії до і після інактивації/стадії обробки. Для дослідження відсутності сторонніх агентів у субстанції усі тверді субстанції розчиняють або суспендують у підходящому середовищі, що забезпечує отримання підходящого препарату для випробування. Тестують достатню кількість препарату, необхідну для отримання підходящої чутливості випробування, відповідно до валідаційних досліджень.

Залежно від ідентифікованих ризиків слід проводити випробування на наявність як живих, так і інактивованих сторонніх агентів.

**Відсутність живих сторонніх вірусів.** Зразки з кожної партії субстанцій загальними і специфічними методами тестують на наявність сторонніх вірусів. Ці випробування валідують щодо чутливості та специфічності на визначення підходящого набору можливих сторонніх вірусів. Використовують клітинні культури з підходящою для сторонніх вірусів чутливістю, включаючи первинні клітини досліджуваних видів субстанцій.

**Загальні випробування.** Інокульовані клітинні культури регулярно спостерігають протягом 21 доби на цитопатичні ефекти. У кінці кожного 7-добового періоду частину вихідних культур фіксують, забарвлюють і досліджують на цитопатичні ефекти, а частину досліджують на гемадсорбуючі агенти.

**Специфічні тести.** Частину наявних клітин після закінчення загальних випробувань тестують на специфічні віруси. За випробовувані специфічні віруси вважаються можливі сторонні віруси, які ідентифіковані при оцінці ризику і які не можуть бути ви-

явлені загальними випробуваннями. Випробування на пестивіруси проводять у вихідних видах, сприйнятливих до них.

**Відсутність бактерій та грибів.** Перед використанням субстанції проводять випробування на стерильність (2.6.1) або стерилізують для інактивації будь-яких бактеріальних та грибкових контамінацій.

**Мікоплазми.** Перед використанням субстанції досліджують на відсутність мікоплазм (2.6.7) або стерилізують для інактивації будь-яких мікоплазматичних контамінацій.

### 5.2.6. ВИЗНАЧЕННЯ БЕЗПЕКИ ВАКЦИН ТА ІМУНОСИРОВАТОК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

У тексті статті термін «продукт» означає або вакцину, або імуносироватку.

При розробці продуктів для демонстрації ризиків з їх застосування на видах-мішенях проводять випробування з безпеки.

**Вакцини.** У лабораторних випробуваннях «доза» означає рекомендовану до застосування кількість продукту, що містить найбільш імовірний для виробничих партій максимальний титр або активність. Живі вакцини готують лише з тих штамів, безпека яких підтверджена. Для живих вакцин використовують партію або партії вакцин, що містять вірус/бактерії найбільш атенуйованого рівня пасажу, присутнього в партії вакцин.

Слід підтвердити безпеку комбінованих вакцин; для живих компонентів комбінованих вакцин слід для кожного окремого штаму підтвердити відповідність спеціальним вимогам, наведеним нижче для живих вакцин.

Для інактивованих вакцин тести з безпеки, проведені на комбінованій вакцині, можуть вважатися достатніми для підтвердження безпеки індивідуальних компонентів.

**Імуносироватка.** У випробуваннях «доза» означає максимально рекомендовану до застосування кількість продукту, яка містить найбільш імовірну для виробничих партій максимальну кількість білка або активність. Крім того, де застосовно, випробовувана доза також має містити максимальну кількість імуноглобуліну або гама-глобуліну.

Випробування, наведені нижче, модифіковані або доповнені випробуваннями розділу «Виробництво» з окремих статей, можуть проводитися в процесі розробки як частина необхідних випробувань, що підтверджують безпеку продукту.

### A. ЛАБОРАТОРНІ ВИПРОБУВАННЯ

**Безпека приймання однієї дози.** Кошним рекомендованим шляхом введення у види й категорії тварин,

для яких призначений продукт, уводять одну дозу продукту. У випробування слід включати тварин наймолодшого рекомендованого віку і, якщо необхідно, вагітних тварин. Тварин не рідше ніж раз на день оглядають і обстежують на наявність аномальних місцевих і системних реакцій. Де застосовно, ці дослідження мають включати детальні *post-mortem* макроскопічні і мікроскопічні дослідження місця ін'єкції. Записують інші об'єктивні критерії, такі як температура тіла (для ссавців) і показники продуктивності. Записують температуру тіла принаймні за день до приймання продукту, під час, через 4 год і в подальші 4 доби після приймання. Тварин оглядають і обстежують до кінця періоду можливої появи очікуваних реакцій, але протягом не менше 14 діб після приймання продукту.

**Вивчення дії на репродуктивність.** Як частину досліджень слід розглянути дію продукту на репродуктивність, якщо є дані про можливі фактори ризику, що залежать від сировини. Якщо зазначено в окремій статті, для кожного шляху введення вивчають дію продукту на репродуктивність самців і невагітних/вагітних самиць, шкідливі впливи на вагітність, включаючи тератогенні й абортівні ефекти.

**Безпека приймання дози, що викликає передозування.** Тваринам-мішеням категорій і видів, імовірно найбільш чутливих до продукту (наприклад, тварини найменшого рекомендованого віку або вагітні тварини, якщо можливо), кожним рекомендованим шляхом уводять дозу, що викликає передозування. Звичайно за дозу, що викликає передозування, вважається 10 доз живих вакцин або 2 дози інактивованого продукту або імуносироватки. Для випробування ліофілізованих живих вакцин 10 доз розчиняють у відповідному об'ємі розчинника. Тварин не рідше як раз на день оглядають і обстежують на наявність аномальних місцевих і системних реакцій. Записують інші об'єктивні критерії, такі як температура тіла (для ссавців) і показники продуктивності. Тварин оглядають і обстежують протягом не менше 14 діб після передозування. Якщо вакцини призначені для застосування вагітним тваринам, випробування проводять у період, коли не протипоказане застосування, а спостереження продовжують принаймні до пологів. Тварин обстежують і записують ефекти на вагітність і потомство. У виняткових випадках, особливо для імуносироваток, якщо є докази неприйнятності передозування, випробування з передозування не проводять і чіткі застереження про потенційні небезпеки включають в інструкцію із застосування продукту.

**Безпека повторного приймання однієї дози.** Повторне приймання однієї дози може бути потрібним для виявлення несприятливих ефектів, що спричиняються таким застосуванням. Ці випробування дуже важливі, якщо продукт, особливо імуносироватки, може застосовуватися в різних випадках протягом відносно короткого проміжку часу. Ці випробуван-

ня проводять на найбільш чутливих категоріях видів-мішеней, використовуючи кожний рекомендований шлях введення. Кількість приймань має бути не менше максимальної кількості, що рекомендується; для вакцин слід враховувати кількість приймань для первинної вакцинації і першу ревакцинацію; для імуносироваток слід враховувати кількість приймань, потрібну для лікування. Інтервал між прийманнями має бути підходящим (наприклад, період ризику або термін, необхідний для лікування) і відповідати рекомендаціям щодо застосування. Але для вакцин для зручності у випробуваннях допускається використання коротших інтервалів, ніж рекомендується для застосування, але не менше 14 діб між прийманнями для прояву будь-яких реакцій гіперчутливості. Проте для імуносироваток приймання слід проводити згідно з рекомендованим графіком. Тварин не рідше ніж раз на день оглядають і обстежують на наявність аномальних місцевих і системних реакцій протягом не менше 14 діб після останнього приймання. Записують інші об'єктивні критерії, такі як температура тіла (для ссавців) і показники продуктивності.

**Залишкові кількості.** Для живих вакцин для профілактики добре відомих зоонозних захворювань може знадобитися визначення залишкових організмів вакцин у ділянці ін'єкції разом із дослідженнями з дисемінації, наведеними нижче.

**Несприятливі ефекти на імунологічні функції.** Якщо застосування продукту може несприятливо вплинути на імунні реакції тварин або їхнього потомства, слід провести відповідні випробування імунологічних функцій.

**Несприятливі ефекти від взаємодій.** Слід провести дослідження для підтвердження безпеки продукту від несприятливого ефекту інших речовин, які рекомендуються до застосування одночасно з досліджуваним, або випробовуваний препарат застосовується як частина графіка приймання ряду продуктів протягом короткого проміжку часу.

**Спеціальні вимоги для живих вакцин.** Для живих вакцин також слід провести наведені нижче лабораторні випробування:

*а) Розповсюдження штамів вакцин.* Розповсюдження штамів вакцин від вакцинованих тварин-мішеней до невакцинованих досліджують, використовуючи рекомендований шлях введення, який найімовірніше спричиняє розповсюдження. Більш того, може бути необхідне вивчення безпеки розповсюдження живих штамів вакцин видам немішеням, які можуть бути надзвичайно сприйнятливими до цих штамів. Слід провести оцінку кількості життєздатних пасажів від тварини до тварини в нормальних умовах, а також оцінку можливих наслідків.

*б) Дисемінація у вакцинованих тваринах.* Кал, сечу, молоко, яйця, оральні, назальні та інші секретії слід

## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

досліджувати на наявність мікроорганізмів. Крім того, можуть знадобитися дослідження з дисемінації штамів вакцин по тілу; особливу увагу слід приділити ділянкам схильним реплікувати організми. Ці дослідження обов'язкові для живих вакцин для профілактики широко відомих зоонозів тварин, використовуваних для виробництва продуктів харчування.

*в) Посилення вірулентності.* Використовують матеріал із рівня пасажу від головної посівної серії до кінцевого продукту, очікувано найбільш вірулентний для видів-мішеней. Використовувані тварини мають бути віку, який підходить для відновлення вірусу, і тварини в усіх групах у момент щеплення мають бути саме цього віку. Первинну вакцинацію проводять, використовуючи рекомендований шлях введення, що очікувано приводить до реверсії вірулентності. Після цього проводять не менше 5 подальших серійних пасажів через тварин видів-мішеней. Пасажі проводять шляхом введення, що найімовірніше веде до реверсії вірулентності. Якщо властивості вірусу дозволяють провести послідовні пасажі 5 групам через природне розповсюдження, може використовуватися цей метод, а інакше — проводять пасаж, як зазначено в кожній окремій статті. Той відновлений вірус, що пройшов максимальну кількість пасажів, тестують на посилення вірулентності. Використовують не менше 2 тварин для кожного пасажу. У кожному пасажі в матеріалі для пересівання показують наявність організмів — похідних живих вакцин. Безпеку матеріалу з найбільш вдалого пасажу порівнюють з безпекою непересіяного матеріалу.

Для деяких вірусів у окремій статті може бути зазначена необхідність проведення пасажів у більшої кількості тварин, якщо, виходячи з наявних даних, обґрунтовано, що це суттєво. Принаймні кінцевий пасаж проводять, використовуючи тварин найбільш підхожих для оцінювання ризику.

*г) Біологічні властивості штамів вакцин.* Для максимально точного визначення характерних біологічних властивостей штамів вакцин (наприклад, нейротропізм) може бути необхідне проведення додаткових випробувань. Для векторних вакцин проводять визначення ризику зміни тропізму або вірулентності штаму і, де необхідно, проводять специфічні випробування. Такі тести систематично проводять там, де продукт стороннього гена вводиться у штам як структурний білок.

*д) Рекомбінація або геномна рекомбінація штаму.* Слід розглянути можливість рекомбінації або гібридизації генома з польовими або іншими штамми.

### В. ПОЛЬОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати лабораторних досліджень звичайно мають доповнюватися підтверджуючими польовими дослідженнями. Якщо є гарантія того, що лабораторними дослідженнями в експериментальних умо-

вах з використанням вакцин мінімального і максимального титру або активності відповідно адекватно оцінені безпека та ефективність продукту, то однією партією можна провести визначення як безпеки, так і ефективності продукту в польових умовах. У цих випадках може бути використана типова рутинна серія з середнім титром або активністю.

Для ссавців, використовуваних у харчовій промисловості, дослідження включають вимірювання температури тіла достатньої кількості тварин до і після приймання продукту; для інших ссавців вимірювання проводять, якщо лабораторні дослідження вказують на можливість виникнення проблеми. Записують розмір, стійкість будь-яких місцевих реакцій і кількість тварин, що проявляють місцеві або системні реакції. Де можливо, проводять оцінку продуктивності.

Оцінка продуктивності бройлерів включає тижневу смертність, зміну співвідношення їжі, вік при забиванні та вагу, падіння і відхилення у виробничих технологіях. Для вакцин, використовуваних для несучок або птахів, що утримуються для відкладання яєць, відповідним чином вивчають дію вакцин на продуктивність відкладання і висиджування яєць.

### С. ЕКОТОКСИЧНІСТЬ

Слід провести оцінку потенційно шкідливих ефектів продукту на навколишнє середовище і передбачити необхідні запобіжні заходи для зменшення таких ризиків. Ступінь імовірного впливу продукту на навколишнє середовище слід оцінювати з урахуванням видів-мішеней і способу приймання; екскреції продукту і розміщення невикористаного продукту. Якщо ці фактори вказують на істотний вплив продукту на навколишнє середовище, визначають потенційну екотоксичність з урахуванням властивостей продукту.

#### 5.2.7. ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВАКЦИН ТА ІМУНОСИРОВАТОК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

У тексті статті термін «продукт» означає або вакцину, або імуносироватку.

При розробці продукту проводять випробування, що демонструють ефективність продукту при введенні кожним шляхом і методом, що рекомендується, використовуючи рекомендовану схему для кожного виду і категорії тварин, яким пропонується застосування продукту. Тип випробування ефективності, яке проводиться, значно варіюється залежно від особливостей продукту.

Як частину здійснюваних випробувань при розробці для встановлення ефективності можна проводити випробування, наведене в розділі «Виробництво», з урахуванням наведеного нижче.

Використовувана доза — та кількість продукту, яка рекомендується до застосування і містить мінімальний титр або активність, очікувані в кінці терміну придатності.

Для живих вакцин використовують партію вакцини, що містить вірус/бактерії найбільш атенуйованого рівня пасажу, присутнього в партії вакцини.

Для імуносироваток, де застосовно, випробовувана доза також має містити мінімальні кількості імуноглобуліну або гама-глобуліну і/або загального білка.

Усі наведені свідчення мають підтверджуватися доказами з ефективності. Наприклад, якщо зазначено, що продукт має захисну дію від респіраторних захворювань, то цю здатність як мінімум слід довести захистом від клінічних ознак респіраторних захворювань. Де зазначена захисна реакція від інфекцій, це слід продемонструвати методом повторного виділення. При заяві більш однієї здатності слід підтвердити кожну з них.

*Вакцини.* Адекватно визначають дію пасивно набутих або материнських антитіл на ефективність вакцин. Будь-які зазначення, встановлені або такі, що мають на увазі, відносно початку та тривалості захисної реакції мають підтверджуватися одержаними результатами досліджень.

Зазначення щодо тривалості імунітету підтримуються доказом захисту. Не обов'язкове використання моделі випробування, наведеної у розділах «Імуногенність» і/або «Активність», для підтримки зазначення щодо тривалості імунітету, викликаного вакциною.

Використовуючи комбіновані вакцини, слід підтвердити ефективність кожного компонента мультивалентних і комбінованих вакцин.

*Імуносироватки.* Особливу увагу слід приділити забезпеченню підтверджуваними даними ефективності рекомендованого режиму застосування. Наприклад, якщо рекомендується використовувати імуносироватку один раз для досягнення профілактичного або терапевтичного ефекту, то це слід підтвердити. Будь-які твердження, встановлені або такі, що мають на увазі, відносно початку та тривалості захисної реакції або терапевтичного ефекту мають підтверджуватися одержаними результатами досліджень. Наприклад, слід вивчити тривалість захисного ефекту після приймання профілактичної дози протисироватки для наведення відповідної вказівки на етикетці або в інструкції щодо застосування.

Проводять дослідження з імунологічної сумісності імуносироваток, якщо рекомендується одночасне їх застосування або вони застосовуються як частина звичайного графіка приймання. Там, де продукт рекомендується як частина схеми приймання, показують початковий або підсилюючий ефекти або внесок продукту в ефективність схеми в цілому.

## ЛАБОРАТОРНІ ВИПРОБУВАННЯ

Взагалі, підтвердження ефективності проводять у добре контрольованих лабораторних умовах провокаційним зараженням тварин-мішеней рекомендованими способами застосування.

Провокаційне зараження слід проводити в умовах максимально наближених до природних умов інфікування, наприклад з урахуванням кількості заражених організмів і шляхів зараження.

*Вакцини.* Якщо немає інших зазначень, провокаційне зараження проводять зі штамом, який відрізняється від того, що використовується при виробництві вакцин.

Якщо можливо, слід визначити імунний механізм (клітини-посередники /гуморальне, місцеве/загальне, класи імуноглобулінів), який запускається в організмі тварин-мішеней при застосуванні вакцин.

*Імуносироватки.* Отримують результати, вимірюючи рівень антитіл, що утворилися після приймання продукту рекомендованим способом видами-мішенями. Якщо є відповідні літературні дані про гарантовано високий рівень захисних антитіл, провокаційне зараження можна не проводити.

Якщо необхідні провокаційні зараження, їх можна провести до або після приймання продукту відповідно до зазначень і встановлених специфічних показників.

## ПОЛЬОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати лабораторних досліджень звичайно мають доповнюватися підтверджуваними польовими дослідженнями, проведеними, якщо немає інших зазначень, на контрольних тваринах, які раніше не пройшли лікування. Якщо є гарантія того, що лабораторними дослідженнями в експериментальних умовах, використовуючи вакцини мінімального і максимального титру або активності відповідно, адекватно оцінені безпека та ефективність продукту, то однією партією можна провести визначення як безпеки, так і ефективності продукту в польових умовах. У цих випадках, де застосовно, може бути використана типова рутинна партія з середнім титром або активністю. Там, де лабораторні дослідження не можуть підтвердити ефективність, допускається подання тільки результатів польових досліджень.

### 5.2.9. ВИЗНАЧЕННЯ БЕЗПЕКИ КОЖНОЇ ПАРТІЇ ВАКЦИН ІМУНОСИРОВАТОК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

У тексті статті термін «продукт» означає або вакцину, або імуносироватку.

*Визначення аномальних реакцій.* У ході досліджень із розробки продукту у світлі випробувань з безпеки



## 5.2. Загальні тексти на біологічні продукти

визначають тип і ступінь реакцій, очікуваних після приймання продукту. Ці визначення нормальних або аномальних місцевих і системних реакцій потім використовують як частину робочої процедури з оцінки безпеки кожної партії на прийнятні та неприйнятні реакції.

**Кількість, що застосовується у випробуванні.** У випробуваннях «доза» означає кількість продукту, яка рекомендується до застосування і містить максимальний титр або активність у межах, зазначених для виробничих партій. Кількість, що застосовується у випробуванні, звичайно зазначають кількістю доз. Для ліофілізованих вакцин 10 доз розчиняють у підходящому об'ємі для випробування. Для продуктів, що складаються з контейнера ліофілізованого компонента (компонентів) і контейнера інактивованого компонента (компонентів), використуваного як розчинник, може бути необхідне використання ще й іншої рідини для розчинення ліофілізованого компонента (компонентів). Вміст двох контейнерів інактивованого компонента, змішаний із вмістом максимальної кількості контейнерів із ліофілізованими живими компонентами, вводять в одну ділянку, а в іншу, якщо зазначено та обгрунтовано, вводять живі ліофілізовані компоненти, розчинені в підходящому розчиннику. Для комбінованих вакцин випробування з безпеки, проведені на комбінованих вакцинах, вважаються достатніми для підтвердження безпеки індивідуальних компонентів.

**Шляхи введення.** Продукт застосовують рекомендованим шляхом введення. У принципі, перевагу слід надавати шляху введення, що дає найбільшу можливість визначити реакції.

Якщо, наприклад, із досліджень з розробки відомо про особливий ризик, проводиться друге приймання, використовуючи відповідну дозу і через часовий інтервал, визначений при розробці.

**Види тварин-мішеней і категорії тварин.** Для вакцинації або приймання продукту використовують тварин мінімального віку й найбільш чутливих видів, якщо немає інших зазначень.

**Кількість тварин.** Використовувану для випробування кількість тварин зазначають в окремій статті. Звичайно для видів ссавців використовують двох тварин і 10 птахів або риб.

**Ідентифікація тварин.** Якщо немає інших зазначень, усі тварини маркуються відповідним способом для забезпечення індивідуальної документації результатів протягом усього періоду спостереження.

**Період спостереження.** Там, де необхідно записувати такий об'єктивний критерій, як температура тіла, тварин оглядають і обстежують протягом не менше трьох діб до приймання продукту. Після приймання продукту тварин оглядають і обстежують не рід-

ше одного разу на добу протягом не менше 14 діб на наявність ознак місцевих і системних реакцій. У день приймання продукту необхідно провести ще одну додаткову інспекцію через 4 год або інтервал, зазначений в окремій статті. Там, де приписане друге приймання продукту, період спостереження закінчується звичайно через 14 діб після другого приймання.

**Місцеві та системні реакції.** Тварин, що виявляють аномальні місцеві або системні реакції, усиплюють. Проводять *post-mortem* макроскопічне дослідження всіх тварин. Може бути зазначена необхідність проведення додаткових мікроскопічних і мікробіологічних досліджень.

Тварин оглядають і обстежують на наявність ознак місцевих і системних реакцій. Якщо відомі корисні індикатори, наприклад температура, маса тіла, інші показники продуктивності та споживання їжі, записують ці критерії.

**Місцеві реакції.** Там, де можливо і необхідно, записують розмір і персистенцію будь-яких місцевих реакцій (включаючи частоту хворобливих реакцій) і співвідношення тварин, що проявляють місцеві реакції.

**Системні реакції.** Звичайно як індикатор системної дії приймання продукту записують температуру та, якщо необхідно, масу тіла. Додатково реєструють усі клінічні симптоми.

**Температура тіла.** Для ссавців протягом періоду спостереження вимірюють температуру тіла. Реєстрацію вимірювань температури тіла починають не менше як за три доби до приймання продукту, у момент приймання, через 4 год і далі через відповідні інтервали. Температура тіла до приймання продукту має бути у фізіологічних межах норми. Якщо передбачається, що приймання продукту може викликати значне підвищення температури (наприклад, продукти, що містять ендотоксини або низку живих вірусних вакцин) або це зазначено в окремій статті (наприклад, підвищення температури не більше ніж на 2 °С для вакцин свинячого актинобациллозу), для відправної точки розробки випробування рекомендується за базову лінію температури тіла брати середнє значення температур діб, передуючих прийманню (наприклад, від -3 до 0 доби).

**Маса тіла та споживання їжі.** Якщо це є вірогідним і корисним індикатором безпеки, наприклад для молодих зростаючих тварин або риб, вимірюють і реєструють масу тіла незадовго перед прийманням і протягом періоду спостереження. Як індикатор дії приймання продукту контролюють і документують споживання їжі. У більшості випадків досить записати денний раціон витрати або часткову або повну відмову від їжі, але в деяких випадках, коли це значущий індикатор безпеки, може бути необхідно записувати фактичну вагу спожитої їжі.

---

**Клінічні ознаки.** Записують усі очікувані або несподівані клінічні ознаки загального характеру, включаючи зміни стану здоров'я або поведінки.

**Протокол досліджень.** Для кожного продукту заповнюють протокол досліджень у світлі очікуваних симптомів. Усі параметри та дані заносять до протоколу. Протоколи містять загальні параметри, а також перелік найбільш явних клінічних симптомів, характерних для даного продукту.

**Критерії повторення випробування.** Якщо зареєстрований аномальний симптом, відповідальний

ветеринар, якщо необхідно, на основі *post-mortem* дослідження визначає, чи є це наслідком приймання продукту чи ні. Якщо не зрозуміла причина аномального симптому або падіж тварин не пов'язаний із прийманням продукту, випробування можна повторити. Якщо в другому випробуванні спостерігається аналогічно першому випробуванню аномальний симптом, продукт не витримує випробування. Реєструється будь-яке лікування тварин у період спостереження. Якщо лікування може вплинути на результати досліджень, проведене випробування вважається невірогідним.

## 5.6. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ

Дана стаття має інформаційний характер.

### 1. ВСТУП

Монографії з інтерферонів людини звичайно містять біологічний метод кількісного визначення, який заснований на здатності інтерферону інгібувати цитопатичну дію вірусу на клітинну лінію в культурі. Проте в більшості випадків не зазначають вірус, клітинну лінію і деталі визначення, що забезпечує відповідну гнучкість, коли стаття описує більш як один підклас інтерферонів.

Ця стаття наведена, щоб надати інформацію з планування, оптимізації та валідації кількісних визначень інтерферонів для відповідної комбінації клітинної лінії і вірусу, що має цитопатичний ефект. Як приклад підходящого методу наведений детальний опис конкретного зразка антивірусного визначення, а також інформація про інші комбінації вірус-клітина та керівництво з адаптації та валідації методик для них.

### 2. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ (ІНГІБУВАННЯ ЦИТОПАТИЧНОГО ЕФЕКТУ)

Кількісне визначення антивірусної активності інтерферону людини засноване на індукції відповіді в клітинах людини, яка запобігає або знижує цитопатичний ефект інфекційного вірусу. Активність інтерферону визначають, порівнюючи його захисну дію проти цитопатичного ефекту вірусу з такою самою дією стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях.

### 3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРФЕРОНУ З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН НЕР2с І ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ЕНЦЕФАЛОМІОКАРДИТУ

Наведений метод кількісного визначення інтерферонів людини належить до одного з типів зменшення цитопатичного ефекту. Для вимірювання активності різних випробовуваних препаратів інтерферонів людини використовують клітини людини Нер2с, інфіковані вірусом енцефаломіокардиту (EMCV). Це кількісне визначення вже було використане Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я (ВООЗ) у трьох міжнародних міжлабораторних визначеннях кандидата в Міжнародні стандарти для альфа-, бета- і гама-інтерферонів людини, і була неодноразово продемонстрована чутливість, надійність і відтворюваність методу при визначенні активності інтерферонів людей різних типів.

Усі процедури з культурами клітин ссавців виконують із використанням стандартних методів культивування таких ліній клітин. Зазначені об'єми реактивів наведені для культивування клітин у 75 см<sup>2</sup> флаконах. Можна використовувати інші типи контейнерів (флакони або чашки), але при цьому слід відповідно змінити об'єми реактивів.

#### 3.1. ВИРОЩУВАННЯ І ПІДГОТОВКА КЛІТИН НЕР2с

Клітини Нер2с підтримують і пересівають у середовищі для культивування А.

Клітини зберігають у замороженому вигляді згідно зі стандартними операційними процедурами. Зростаючі клітини можуть утримуватися в культурі протягом дозволеної кількості пасажів — 30, після чого закладають нові культури із замороженого запасу.

На початку дослідження збирають клітини з флаконів із 90 % суцільним моношаром, застосувавши метод обробки трипсином, наведений нижче.

- 3 флаконів видаляють середовище для культивування.
- До кожного флакона додають по 5 мл розчину трипсину, нагрітого до температури 37 °С (початковий розчин трипсину містить 4 мг/мл трипсину Р і 4 мг/мл натрію едетату Р; безпосередньо перед застосуванням розчин розводять у 50 разів фосфатним забуференим сольовим розчином). У закупорених флаконах обертальними рухами змочують моношар клітин. Видаляють надлишок розчину трипсину.
- Інкубують флакони протягом від 5 хв до 10 хв при температурі 37 °С. Під мікроскопом або візуально досліджують клітини на наявність ознак відкріплення від скла. При дослідженні під мікроскопом клітини мають бути закругленими або відкріпленими від скла та вільно плаваючими. Енергійно струшують флакон для відшарування всіх клітин і додають близько 5 мл середовища для культивування А. Енергійно струшують флакон до отримання суспензії окремих клітин.
- Для приготування клітинних суспензій для процедур кількісного визначення обережно диспергують клітини піпетуванням вгору-вниз для руйнування агрегатів клітин, підраховують кількість клітин і ресуспендують їх до концентрації  $6 \times 10^5$  клітин/мл.

#### 3.2. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ЕНЦЕФАЛОМІОКАРДИТУ

Вірус енцефаломіокардиту розмножують у клітинах L-929 мишей для створення запасу потомства вірусу. Клітини L-929 культивують за допомогою трипсинізації і пасажу, як зазначено для клітин Нер2с (*ПРИМІТКА: у разі поганого росту клітин може виникнути необхідність заміни сироватки телячої неонатальної на сироватку бичачу ембріональну*).

## 5.6. Кількісне визначення інтерферонів

Беруть декілька флаконів із суцільним моношаром клітин L-929. Видаляють із флаконів середовище. Інокують 2 мл суспензії EMCV, відповідним чином розведеною середовищем для культивування В, так, щоб вийшло близько  $2.5 \times 10^8$  бляшкоутворюючих одиниць (БУО (PTF)) на мілілітр. Оскільки кожен флакон містить  $4-6 \times 10^7$  клітин L-929, множинність інфекції (м.і., т.о.і.) складатиме близько 10 БУО/клітину. Обережно обертальними рухами розподіляють вірусну суспензію по всьому моношарі клітин і флакони витримують в інкубаторі протягом близько 1 год. рН середовища підтримують на рівні від 7.4 до 7.8.

Після адсорбції EMCV до кожного флакона додають по 40 мл середовища для культивування В і флакони інкубують при температурі 37 °С протягом 30 год. рН середовища підтримують на рівні від 7.4 до 7.8 для отримання максимального виходу вірусу. Культуральну рідину збирають і зберігають при температурі близько 4 °С.

Флакони витримують при температурі  $-20$  °С для заморожування моношару клітин. Потім розморожують їх при кімнатній температурі. Додають близько 5 мл середовища для культивування і струшують флакони для руйнування клітинних стінок. Вміст кожного флакона переносять у контейнер із культуральною рідиною. Отриману культуральну рідину, що містить EMCV, переносять у центрифужні пробірки місткістю 50 мл і центрифугують при 500 g протягом близько 10 хв для видалення уламків клітин. Очищену культуральну рідину розливають у скляні флакони з кришками, що закручуються, по 20 мл, 10 мл, 5 мл, 1 мл, 0.5 мл або 0.2 мл, відповідно, і зберігають при температурі  $-70$  °С. Якщо необхідно, великі об'єми можна розморожувати, розливати меншими порціями і повторно заморожувати. EMCV зберігає свій початковий титр, якщо постійно зберігається при температурі близько  $-70$  °С, але повторні цикли заморожування-розморожування або зберігання при вищій температурі, наприклад  $-20$  °С, призводять до швидкого падіння титру.

### 3.3. МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

#### 3.3.1. Визначення діапазону доза-відповідь

##### Приготування розчинів

Відповідний стандартний препарат інтерферону (наприклад, специфічний субтип стандартного препарату інтерферону ВООЗ) розводять у середовищі для культивування А з індексом розведення 10 для отримання доз, що покривають діапазон 1000-0.001 МО/мл. Випробування проводять у 96-лунковому мікропланшеті. У кожен лунку додають по 100 мкл середовища для культивування А, по 100 мкл кожного розведення стандартного препарату в усі лунки, крім тих лунок, які призначені для контролю вірусу. Перемішують вміст кожної лунки мікропланшета, використовуючи багатоканальну піпетку, виставлену на 100 мкл.

##### Розлив клітинної суспензії

Суспензію клітин Her2c, що містить близько  $6 \times 10^5$  клітин в 1 мл середовища для культивування А, розливають у пластикову чашку Петрі. За допомогою багатоканальної піпетки, виставленої на 100 мкл, переносять по 100 мкл цієї суспензії в кожен лунку мікропланшета.

Планшети інкубують протягом 24 год при температурі 37 °С і 5 % CO<sub>2</sub>.

##### Зараження вірусом

На цій стадії, використовуючи інверсійний мікроскоп, перевіряють стан клітин Her2c: моношар має бути суцільним, клітини мають бути відносно однорідно розподілені, повинні мати правильну морфологію і бути здоровими.

Видаляють більшу частину середовища з лунок, перевернувши планшет і витрусивши його вміст на паперову серветку (так само чинять для видалення рідини з мікропланшета, як зазначено далі). Початковий EMCV розводять свіжим середовищем для культивування А до титру близько  $3 \times 10^7$  БУО/мл (ПРИМІТКА: для кожної чашки необхідно близько 20 мл розведеного вірусу, плюс від 5 % до 10 % додаткового об'єму). Розведену клітинну суспензію з 9 см стерильної чашки Петрі розливають по 200 мкл багатоканальною піпеткою, виставленою на 200 мкл, у всі лунки, включаючи лунки контролю вірусу, окрім лунок контролю клітин. У кожен лунку контролю клітин додають по 200 мкл середовища для культивування А без вірусу.

Планшети витримують в інкубаторі близько 24 год при температурі 37 °С і 5 % CO<sub>2</sub>.

##### Забарвлення

Під мікроскопом досліджують планшети для оцінки цитопатичного ефекту (ц.п.е.) EMCV у контролях вірусу. Час розвитку максимального ц.п.е. може варіюватися від одного визначення до іншого через властиву клітинам Her2c мінливість реакції на зараження вірусом у кожний певний період безперервного культивування.

Зливають середовище для культивування з лунок у підходящий деконтамінуючий розчин (за підходящий вважається розчин натрію гіпохлориду). У кожен лунку додають фосфатний забуферений солевий розчин рН 7.4. Потім зливають його в деконтамінуючий розчин. У кожен лунку додають по 150 мкл забарлюючого розчину і залишають планшет на близько 30 хв при кімнатній температурі. Зливають забарлюючий розчин у деконтамінуючий розчин. У кожен лунку додають по 150 мкл фіксуючого розчину і витримують протягом 10 хв при кімнатній температурі. Зливають фіксуючий розчин у деконтамінуючий розчин. Промивають моношар клітин, занурюючи планшети в пластикову коробку з проточною водою. Зливають воду та висушують поверхню планшетів за допомогою паперових рушників. Планшети вису-

шукють при температурі від 20 °С до 37 °С до повного випаровування вологи.

У кожну лунку додають по 150 мкл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. Барвник елюють обережним обертанням планшета або легким постукуванням об долоню руки. Перед визначенням спектрофотометрією слід упевнитися, що барвник рівномірно розподілений в лунках.

Використовуючи спектрофотометр для вимірювання абсорбції у мікропланшетах, вимірюють абсорбцію за довжини хвилі від 610 нм до 620 нм, використовуючи як холосту пробу лунку або ряд лунок без клітин, що містять 150 мкл 0.1 М розчину натрію гідроксиду.

Визначають концентрації стандартного препарату інтерферону, що спричиняють максимальне і мінімальне зниження цитопатичного ефекту. Це доза-відповідь, яка відповідає робочому діапазону визначення.

### 3.3.2. Методика кількісного визначення

Проводять визначення, наведене вище, використовуючи:

- як розчини для випробування випробовувану субстанцію, розведену середовищем для культивування А (фактор розведення 2), для отримання номінальних концентрацій, що покривають робочий діапазон визначення;
- як стандартні розчини відповідний стандартний препарат інтерферону (наприклад, специфічний субтип інтерферону ВООЗ), розведений середовищем для культивування А (з індексом розведення 2), для отримання номінальних концентрацій, що покривають робочий діапазон визначення.

### 3.3.3. Аналіз результатів

Результати визначення зниження цитопатичних ефектів звичайно вкладаються в сигмоїдальну криву доза-відповідь при побудові графіка залежності концентрації інтерферону (log еквівалентного розведення інтерферону) від абсорбції барвника.

Будують графік залежності концентрації інтерферону (log еквівалентного розведення інтерферону) від абсорбції барвника для розчинів стандартного препарату інтерферону і випробовуваного препарату. За лінійною частиною кривої розраховують концентрацію інтерферону в зразку, порівнюючи результати для випробовуваних і стандартних розчинів, використовуючи звичайні статистичні методи визначення паралельних ліній.

## 4. ВАЛІДАЦІЯ ІНШИХ МЕТОДИК

### 4.1. ВИБІР КЛІТИННИХ ЛІНІЙ І ВІРУСІВ

Для визначення антивірусної активності інтерферонів використовувалися багато інших комбінацій

ліній клітин і вірусів, наприклад: EMCV використовували в комбінації з лінією епітеліальних клітин карциноми легені А549; вірус Semliki Forest або Sindbis використовували з людськими фібробластами; вірус стоматиту везикули використовували або з людськими диплоїдними фібробластами, лінією клітин амніона людини WISH, або лінією клітин нирки бика Madin-Darby. Кожного разу вибір комбінації клітинна лінія/вірус звичайно базується на тому, яка з них найбільш чутлива до випробовуваного препарату інтерферону й аналогічно відповідає при порівнянні випробовуваного препарату зі стандартним.

### 4.2. ВИБІР РЕАКЦІЙ

Методика забарвлення, наведена вище, дозволяє визначати кількість життєздатних клітин. Використовують низку інших реакцій, зокрема методику забарвлення метил-фіолетовим або кристалічним фіолетовим або методику конверсії тіазоліл блакитного (МТТ). Кожного разу метод вибирають на основі отримання відповідних лінійних і чутливих взаємозв'язків між кольором реакції і числом життєздатних клітин.

### 4.3. СТАТИСТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ

Як і для всіх інших біологічних визначень за моделлю паралельних ліній, визначення має задовольняти звичайні статистичні критерії лінійності відповіді, паралельності та варіабельності.

### 4.4. ВАЛІДАЦІЯ ФОРМАТУ ВИЗНАЧЕННЯ

Як і для всіх методик із використанням мікропланшетів, слід приділити особливу увагу валідації формату кількісного визначення. Особливо слід вивчити і виключити систематичну помилку через нерандомізований порядок піпетування або крайові ефекти планшетів. Для цього слід проводити рандомізацію формату визначення або не використовувати крайні лунки.

### РЕАКТИВИ ТА СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ

*Середовище для культивування А (10 % сироватка теляча неонатальна)*

Середовище для культивування RPMI 1640, доповнене, якщо необхідно, антибіотиками (пеніцилін 10 000 МО/мл; стрептоміцин 10 нг/мл)	450 мл
L-глутамін, 200 мМ, стерильний	5 мл
Сироватка теляча неонатальна	50 мл

## 5.6. Кількісне визначення інтерферонів

*Середовище для культивування В (2 % сироватка бичача ембріональна)*

Середовище для культивування RPMI 1640, доповнене, якщо необхідно, антибіотиками (пеніцилін 10 000МО/мл; стрептоміцин 10 нг/мл) 490 мл  
L-глутамін, 200 мМ, стерильний 5 мл  
Сироватка бичача ембріональна 10 мл

*Фіксуєчий розчин*

Формальдегід, 40 % 100 мл  
Кислота оцтова льодяна 90 мл  
Натрію ацетат безводний 8.2 г  
Вода до об'єму 1000 мл

*Забарвлюючий розчин*

Нафталіновий чорний 0.5 г  
Кислота оцтова льодяна 90 мл  
Натрію ацетат безводний 8.2 г  
Вода до об'єму 1000 мл

## 5.14. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, ПЕРЕНОСНИКИ ГЕНІВ, ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Дана загальна стаття має інформаційний характер.

Дана загальна стаття містить матеріали про лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною. Ці матеріали забезпечують прийнятні рамки вимог щодо виробництва та контролю якості цих препаратів. Для специфічних лікарських засобів застосування цих вимог і необхідність інших матеріалів вирішується компетентним уповноваженим органом. Наведена стаття розроблена для затверджених препаратів; необхідність використання частини або всієї статті для препаратів на різних стадіях клінічних випробувань вирішується компетентним уповноваженим органом. Положення статті не виключають застосування альтернативних методів виробництва та контролю препаратів, які прийнятні для компетентного уповноваженого органу.

Подальші докладні рекомендації щодо лікарських засобів, переносників генів, для застосування людиною наведені у Примітці до Керівництва з якості, доклінічних і клінічних аспектів досліджень лікарських засобів, переносників генів (*Note for Guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (CPMP/BWP/3088/99)*) і Директиві щодо розробки та виробництва лентивірусних векторів (*Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors (CHMP/BWP/2458/03)*) Комітету медичних продуктів для застосування людиною (включаючи будь-які подальші перегляди цих документів).

### ВИЗНАЧЕННЯ

У рамках цієї загальної статті лікарським засобом, переносником генів (ЛЗПГ), називають препарат, отриманий серією виробничих процесів, метою яких є перенесення *in vivo* або *ex vivo* профілактичного, діагностичного або терапевтичного гена (тобто частки нуклеїнової кислоти) в людські/тваринні клітини і його подальша експресія *in vivo*. Перенесення гена задіє систему експресії, що міститься у системі постачання, відомій під назвою вектора, який може мати вірусне, а також невірусне походження. Вектор також може вводитися в людські або тваринні клітини.

Рекомбінантні вектори, такі як вірусні вектори та плазміди. Рекомбінантні вектори або вводять безпосередньо в тіло пацієнта (перенесення генів *in vivo*), або переносять у клітини-хазяїна перед введенням цих генетично модифікованих клітин пацієнтові (перенесення генів *ex vivo*). Вірусні вектори отримують із різних вірусів (наприклад, аденовірусів, поксвірусів, ретровірусів, лентивірусів, аденоасо-

ційованих вірусів, вірусів герпесу). Ці вектори можуть бути реплікативними, нереплікативними або умовно реплікативними. Плазмідні вектори містять нуклеїнові кислоти в простому складі (наприклад, «оголена» ДНК) або у вигляді комплексу з різними молекулами (синтетичні вектори, такі як ліпіди або полімери). Перенесений ЛЗПГ генетичний матеріал складається з нуклеотидних послідовностей, які можуть кодувати продукти генів, антисмислові транскрипти або рибозими. Положення даної загальної статті не стосуються хімічно синтезованих олігонуклеотидів. Після перенесення генетичний матеріал може залишатися в цитоплазмі або епісомах або може інтегруватися в геном клітини-хазяїна залежно від того, чи це інтеграційний або неінтеграційний вектор.

*Генетично модифіковані клітини.* Генетично модифіковані еукаріотичні або бактеріальні клітини модифікують векторами для експресії передбачуваного продукту.

### ВИРОБНИЦТВО

*Використовувані у виробництві субстанції.* Сировина, використовувана у виробництві, включаючи вірусні посівні серії та закладені банки клітин, де застосовно, має бути кваліфікована. Якщо немає інших зазначень, усі використовувані субстанції мають бути отримані в ході процесів, керованих відомими системами якості за допомогою відповідного виробничого обладнання. Встановлюють відповідні специфікації, особливо для контролю ідентичності, активності (де застосовно), чистоти та безпеки щодо мікробіологічної чистоти та забруднення бактеріальними ендотоксинами. Якість використаної води має відповідати вимогам, наведеним в окремих статтях («Вода очищена», «Вода високоочищена» і «Вода для ін'єкцій»). Якість використаної сироватки має відповідати вимогам, наведеним в окремій статті «Сироватка бичача». Застосування антибіотиків у процесі виробництва, якщо можливо, слід виключити.

*Вірусна безпека.* Мають витримуватися вимоги, наведені в статті (5.1.7).

*Трансмівна губчаста енцефалопатія (5.2.8).* Проводять оцінку ризику щодо трансмісивної губчастої енцефалопатії і вживають відповідних запобіжних заходів із мінімізації таких ризиків.

## Рекомбінантні вектори

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Для вірусних векторів виробництво засноване, де можливо, на системі банків клітин і системі вірусних посівних серій.

Для плазмідних векторів виробництво засноване на системі банків бактеріальних клітин.

Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вектора відповідної якості. Якщо немає інших зазначень, вектор у кінцевому продукті від головної посівної серії має пройти не більше пасажів або субкультур, ніж той, який використовувався для приготування вектора, що в клінічних випробуваннях продемонстрував задовільні результати з безпеки та ефективності.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВЕКТОРА

Використовувані субстрати мають відповідати вимогам Фармакопеї (5.2.2, 5.2.3) і розділу «Бактеріальні клітини, використовувані для виробництва плазмідних векторів для застосування людиною».

### ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРА

Документують архівні записи щодо конструкції вектора, включаючи походження вектора та подальші маніпуляції з ним, і ділянок, суттєво віддалених або модифікованих.

Вектор характеризують, використовуючи підхожі й валідовані методи.

Підхожими методами оцінюють генетичну стабільність вектора на рівні та після максимального рівня пасажів або максимальної кількості клітинних подвоень клітинних ліній, використовуваних при виробництві.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять на ділянці, де одночасно не обробляються інші клітини або вектори. Кваліфікують будь-який матеріал тваринного або людського походження, використовуваний при приготуванні клітинної суспензії та середовища для культивування. Чистоту збору перевіряють підхожими випробуваннями, як визначено у відповідному специфічному розділі.

### ОЧИЩЕНИЙ ЗБІР

Основну масу активної субстанції називають серією очищених рекомбінантних векторів (вірусні вектори, «оголені» або комплексовані плазміди).

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Якщо немає інших зазначень, процес змішування компонентів і розфасування нерозфасованої кінцевої серії проводять в асептичних умовах, використовуючи стерильні контейнери (3.2).

Стабільність кінцевої серії оцінюється з використанням звітів зі стабільності, включаючи тривалість,

умови зберігання, кількість тестованих серій, графік випробувань і кількісні визначення, що проводяться.

### ВИПРОБУВАННЯ І КІЛЬКІСНІ ВИЗНАЧЕННЯ

ЛЗПГ мають витримувати випробування і кількісні визначення, наведені у відповідних специфічних розділах.

## Генетично модифіковані клітини

Для клітин, які модифікуються рекомбінантним вектором, дані щодо рекомбінантного вектора документують відповідно до вимог, наведених вище в розділі «Рекомбінантні вектори».

### ВИРОБНИЦТВО

#### КЛІТИННИЙ СУБСТРАТ

Для ксеногенних клітинних ліній, включаючи бактеріальні клітини, створюють систему банку клітин, що складається із головного та робочих банків клітин.

Для аутологічних і алогенних клітин, де можливо, створюють систему банку клітин, що складається з головного і робочих банків клітин.

#### ТРАНСФЕКЦІЯ / ТРАНСДУКЦІЯ

Клітини трансфікують або трансдукують, використовуючи рекомбінантний вектор (плазмиду або вірусний вектор), кваліфікований, як наведено вище в розділі «Рекомбінантні вектори»; процес валідують. Усі технологічні процеси проводять в асептичних умовах на ділянці, де одночасно не обробляються інші клітини або вектори. Всі реактиви, використовувані на всіх стадіях маніпуляцій з клітинами, слід досконально кваліфікувати. Трансфекцію або трансдукцію проводять в асептичних умовах.

#### КІНЦЕВА СЕРІЯ

При зберіганні в замороженому стані слід визначити життєздатність генетично модифікованих клітин до заморожування та після розморожування.

Якщо клітини не використовуються відразу після приготування, слід визначити їх стабільність, перевіряючи життєздатність клітин і експресію генетичних вставок.

Якщо генетично модифіковані клітини до імплантації людині інкапсулюють, кожен використаний компонент вважається частиною кінцевого продукту, проходить контроль якості та детально характеризується (наприклад, фізична цілісність, селективна проникність, стерильність).



## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

### ВИПРОБУВАННЯ І КІЛЬКІСНІ ВИЗНАЧЕННЯ

Контроль ксеногенних, алогенних або аутологічних клітин включає таке:

- ідентичність, підрахунок життєздатних клітин;
- загальну цілісність, функціональність, кількість копій на клітину (копійність), ефективність перенесення й експресії генетичних вставок;
- мікробіологічний контроль (2.6.1 або 2.6.27), вміст ендотоксинів, забруднення мікоплазмами (2.6.7), випадкове вірусне забруднення і, якщо необхідно, утворення реплікативного вектора.

У необхідних випадках, коли термін придатності клітин обмежений, компетентний уповноважений орган може затверджувати скорочену програму тестування і, якщо необхідно, продукт може бути випущений до завершення певних випробувань.

## ПЛАЗМІДНІ ВЕКТОРИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

### ВИЗНАЧЕННЯ

Плазмідні вектори для застосування людиною є дволанцюговими кільцевими формами бактеріальної ДНК, які несуть ген, що цікавить, або нуклеотидну послідовність, що кодує антисмислові послідовності або рибозими і їхні експресійні касети; вони позахромосомно ампліфікуються в бактеріях. Вони використовуються для перенесення генетичного матеріалу в людські соматичні клітини *in vivo* або для генетичної модифікації аутологічних, алогенних, ксеногенних або бактеріальних клітин перед введенням людині. Плазмідні вектори можуть бути подані у вигляді «оголеної» ДНК або у складі синтетичних систем доставки, таких як ліпіди (ліпоплекси), полімери (поліплекси) і/або пептидні ліганди, які полегшують перенесення через клітинну мембрану та доставку в клітину або цільову доставку через специфічні рецептори.

Плазмідні у складі синтетичних систем доставки не є предметом обговорення цього розділу.

### ВИРОБНИЦТВО

#### СТРУКТУРА ПЛАЗМІДИ

Типовий плазмідний вектор складається із:

- основи плазмідного вектора, що містить численні сайти впізнавання рестрикційними ендонуклеазами для вбудовування генетичної вставки і бактеріальних елементів, необхідних для напруження плазміди, таких як селективні генетичні маркери для ідентифікації клітин, що несуть рекомбінантний вектор;
- необхідних регуляторних генетичних елементів, що сприяють експресії генетичної вставки;

- генетичної вставки;
- сигналу поліаденілування.

Повний опис плазмідної ДНК, включаючи її нуклеотидну послідовність, установлюють ідентифікацією, джерелом, способами виділення і нуклеотидною послідовністю генетичної вставки. Документують джерело та функції складових частин плазміди, таких як ділянки початку реплікації, вірусні й еукаріотичні промотори та гени, що кодують маркери селекції.

### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**Банки клітин.** Виробництво плазмідних векторів засноване на системі банків бактеріальних клітин зі створенням і характеристикою головного банку клітин (ГБК, МСВ), робочих банків клітин (РБК, WCB) і клітин кінцевої стадії виробництва (ККСВ, ЕОРС), які відповідають вимогам, наведеним в розділі «Бактеріальні клітини, використовувані для виробництва плазмідних векторів для застосування людиною». Сировину, використовувану у виробничих процесах, включаючи закладання банку клітин, слід кваліфікувати.

**Техніка відбору.** Якщо немає інших зазначень і дозволів, при конструюванні вектора як селективні генетичні маркери не використовують гени стійкості до антибіотиків, особливо до антибіотиків, що застосовуються в клінічній практиці. Для рекомбінантних плазмід краще застосувати інші методи селекції.

**Стандартні препарати.** Підхожу партію розробленої плазміди, переважно ту, на якій отримані клінічні результати, детально характеризують і зберігають для застосування в рутинних випробуваннях як стандартний препарат.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Плазмідну ДНК переносять у бактеріальні клітини-хазяїв, і одиничний клон трансформованих бактерій розмножують для створення МСВ. Потім з МСВ одержують WCB. У процесі виробництва з WCB ферментацією одержують ЕОРС.

Плазмідну ДНК виділяють з одержаних клітин, використовуючи стадію екстракції, й очищують для отримання нерозфасованого препарату.

Якщо немає інших зазначень, у виробництві не використовують градієнт густини хлориду цезію-бромистого етидію.

### ОЧИЩЕНА ПЛАЗМІДА

Процес виробництва оптимізують для видалення домішок, зберігаючи активність препарату. Вимога до перевірки препарату на вміст конкретних домішок залежить від:

- продемонстрованої здатності виробництва і процесів очищення видаляти або інактивувати

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

домішку, використовуючи специфічні кількісні методи у процесі валідації;

- потенційної токсичності, пов'язаної з домішкою;
- можливого зменшення ефективності продукту з генетичною вставкою через домішку.

Якщо для відбору використовували селективну стійкість до специфічних антибіотиків, необхідно, щоб дані валідаційних досліджень підтверджували здатність процесів очищення видаляти залишкові антибіотики.

Проводять відповідні внутрішньовиробничі перевірки, які підтверджують, що процес постійно знаходиться під контролем; наприклад, перевіряють кількість та форми плазмиди, кількість ендотоксинів після стадії екстракції.

Тільки серія очищеної плазмиди, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися.

**Ідентичність і цілісність очищеної плазмиди.** Ідентичність і цілісність очищеної плазмиди встановлюють підходящими методами, такими як секвенування або методи ампліфікації нуклеїнових кислот (МАНК, NAT) (2.6.21); рестрикційний аналіз можна використовувати тоді, коли цього досить, щоб визначити потенційні критичні модифікації у плазмиді і підтвердити її ідентичність.

**Плазмідна ДНК.** Наступні зазначення наведені як приклади.

Концентрацію ДНК більше 500 нг/мл можна визначити вимірюванням поглинання за довжини хвилі 260 нм. Оптичне поглинання розчину, що містить 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК, дорівнює 1 (питоме поглинання — 200).

Концентрацію ДНК менше 500 нг/мл можна визначити подальшою інкубацією із флуоресцентними барвниками, які специфічно зв'язуються із дволанцюговими ДНК, використовуючи стандартний препарат ДНК для побудови калібрувальної кривої.

Для визначення концентрації плазмідної ДНК також можна застосовувати рідинну хроматографію, використовуючи стандартний препарат. У деяких випадках також застосовний капілярний електрофорез.

**Форми ДНК.** Плазмідну ДНК характеризують, виходячи зі співвідношення суперспіральних, мультимірних, розкручених мономірних і лінійних форм, використовуючи підхожі аналітичні методи, приклади яких наведені нижче. Для кількісного визначення суперспіральних форм використовують іонообмінну високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) або капілярний електрофорез. Капілярний електрофорез також може бути використаний для кількісного визначення інших форм ДНК.

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Вміст залишкових кількостей ДНК клітин-хазяїнів визначають, вико-

ристовуючи підхожі аналітичні методи, поки процес не валідований і не підтверджена відповідна чистота. Рекомендується використання методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) через її чутливість і специфічність, але допускається застосування й інших підходящих методів.

**Залишкова РНК.** Вміст залишкової РНК визначають, поки процес не валідований і не підтверджена відповідна чистота. Можуть бути використані обернено-фазова ВЕРХ (ОФ ВЕРХ) або кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотньою транскрипцією (2.6.21), якщо потрібне визначення нижчих концентрацій.

**Залишкові білки клітин-хазяїнів.** Концентрацію залишкових білків клітин-хазяїнів визначають, використовуючи стандартні кількісні методи визначення білків (2.5.33), ДСН-електрофорез у поліакриламідному гелі (ДСН-ПАГ) з подальшим забарвленням сріблом або специфічним імуноаналізом, таким як вестерн-блотинг або ELISA, поки процес не валідований і не підтверджена відповідна чистота.

**Мікробіологічна чистота.** Залежно від випробовуваного зразка мають витримувати випробування на стерильність (2.6.1) або має бути визначене біозабруднення (2.6.12).

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

### КІНЦЕВИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ ПРОДУКТ

Декілька очищених зборів можуть бути об'єднані при приготуванні кінцевого нерозфасованого продукту. Можуть бути додані стабілізатори й інші допоміжні речовини. Приготований продукт фільтрують крізь бактеріальні фільтри.

Тільки кінцевий нерозфасований продукт, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцевий нерозфасований продукт має витримувати випробування на стерильність.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Плазмідний вектор ідентифікують за допомогою рестрикційного аналізу або секвенування. Для ідентифікації препарату також можна використовувати випробування на біологічну активність.

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

### ВИПРОБУВАННЯ

Випробування кінцевої серії включають таке:

Опис.

**pH (2.2.3).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Об'єм, що витягається (2.9.17).** Препарат має витримувати випробування на об'єм, що витягається.

**Залишкова волога (2.5.12).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Форми ДНК.** Відсотковий вміст специфічних мономерних суперспіральных форм визначають, як зазначено для очищеної плазмід.

**Стерильність (2.6.1).** Препарат має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше меж, встановленої для конкретного препарату.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Плазмідна ДНК.** Не менше кількості, зазначеної на етикетці, визначеної, наприклад, першим з наведених нижче методів.

Концентрацію ДНК більше 500 нг/мл визначають вимірюванням поглинання за довжини хвилі 260 нм. Оптичне поглинання розчину, що містить 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК, дорівнює 1 (питоме поглинання – 200).

Концентрацію ДНК менше 500 нг/мл визначають подальшою інкубацією з флуоресцентними барвниками, які специфічно зв'язуються із дволанцюговими ДНК, використовуючи стандартний препарат ДНК для побудови калібрувальної кривої.

Для визначення концентрації плазмідної ДНК також можна застосовувати рідинну хроматографію, використовуючи стандартний препарат. У деяких випадках також застосовний капілярний електрофорез.

**Біологічна активність.** Де можливо, біологічну активність визначають *in vitro* або *in vivo* підходящими випробуваннями. Для позитивного контролю випробування необхідні добре описані репрезентативні стандартні препарати. Біологічні випробування, використовувані для кількісного визначення плазмідних векторів, звичайно включають трансфекцію відповідних клітинних ліній *in vitro* з подальшими деякими вимірюваннями функціональної активності експресованої генетичної вставки. Такий аналіз дає інформацію про функціональну активність кодованого генетичною вставкою продукту, а не тільки про рівень експресії самої генетичної вставки.

Разом з біологічними аналізами може бути необхідне проведення вестерн-блотинг аналізу або ELISA для оцінки цілісності та кількості експресованого продукту.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- концентрацію плазмідної ДНК;
- дозу, що рекомендується для людини;
- для ліофілізованого препарату:
  - назву й об'єм рідини, яку слід додати для розчинення;
  - термін придатності препарату після розчинення.

## БАКТЕРІАЛЬНІ КЛІТИНИ, ВИКОРИСТОВУВАНІ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПЛАЗМІДНИХ ВЕКТОРІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Виробництво плазмідних векторів для застосування людиною засноване на системі банків бактеріальних клітин із формуванням і характеристикою головного банку клітин (МСВ), робочих банків клітин (WCB) і клітин кінцевої стадії виробництва (ЕОРС). Банк бактеріальних клітин для виробництва плазмідних векторів – це колекція ємностей, що містять бактеріальні клітини, які зберігаються в певних умовах, мають однаковий склад, одержані з пулу клітин одного клону-трансформованого штаму-хазяїна. МСВ має відому, документовану історію; краще його отримувати з характеризованого депонованого джерела. WCB отримують розмноженням клітин з одного або декількох контейнерів МСВ. Документують методи та реактиви, використовувані при банкуванні клітин і їх зберіганні.

МСВ і WCB характеризують тестуванням аліквот матеріалу, що зберігається, або тестуванням субкультури банку клітин.

У наведеній нижче таблиці зазначені випробування, необхідні для кожної стадії виробництва.

Випробування	Штам хазяїнський <sup>1</sup>	МСВ	WCB	ЕОРС*
Ідентичність і чистота				
Життєздатність	+	+	+	+
Характеристика бактеріального штаму	+	+	-	+
Генотипування/ фенотипування	+	+	-	+
Наявність плазмід				
— Секвенування ДНК плазмід	-	+	-	+
— Кількість копій	-	+	+	+

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

Випробування	Штам хазяйський <sup>1</sup>	МСВ	WCB	ЕОРС*
— Рестрикційна карта	-	+	+	+
— Відсоток клітин, що містять плазмиду	-	+	+	+
Випадкові агенти				
Чистота посівом	+	+	+	+
Наявність бактеріофагів	+	+	-	+

\* ЕОРС — це клітини, що пройшли кількість пасажів принаймні еквівалентну тій, що використовується для виробництва. Аналіз слід проводити один раз для валідації кожного нового WCB, за винятком чистоти, яку слід визначати для кожної ферментації.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ І ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Життєздатність.** Кількість життєздатних клітин визначають посівом розведеної аліквоти бактеріальних клітин на відповідні середовища і підрахунком індивідуальних колоній.

**Біохімічні та фізіологічні характеристики бактеріальних штаблів.** Залежно від використовуваного у виробництві бактеріального штаму проводять відповідну біохімічну і фізіологічну характеристикацію штаму для підтвердження ідентичності клітин на рівні виду.

**Генотипування/фенотипування.** Генотип бактеріальних клітин перевіряють, визначаючи підходжі специфічні фенотипічні маркери, або проводять відповідний генетичний аналіз.

#### Наявність плазмиди

**Секвенування.** Верифікується вся нуклеотидна послідовність плазмиди.

**Кількість копій.** Плазмідну ДНК виділяють й очищують з відомої кількості бактерій і визначають кількість копій відповідним методом, таким як кількісна ПЛР (2.6.21).

**Рестрикційна карта.** Проводять розщеплювання рестрикційною ендонуклеазою так, щоб отримані фрагменти можна було ідентифікувати електрофорезом для перевірки незмінності структури плазмиди в бактеріальних клітинах.

**Відсоток клітин, що містять плазмиду.** Для визначення відсотка бактерій, що містять плазмиду, використовують бактеріальні елементи, присутні в плазміді, такі як селективні генетичні маркери.

### ВИПАДКОВІ АГЕНТИ ТА ЕНДОГЕННІ ВІРУСИ

**Перевірка чистоти посівом.** Бактеріальні клітини штриховим посівом наносять на відповідне се-

редовище й інкубують в потрібних умовах для виявлення потенційного бактеріального забруднення. Для виявлення інгібіторів зростання забруднюючих організмів проводять додаткове випробування у присутності певної кількості відповідного позитивного бактеріального контролю. Досліджують відповідну кількість колоній; не має виявлятися забруднення.

**Наявність бактеріофагів.** Бактеріальні клітини висівають і інкубують у середовищі, що дозволяє розмноження бактеріофагів, для перевірки наявності бактеріофагів. Випробування валідують, використовуючи як позитивний контроль еталонні штами бактеріофагів і пермісивні клітини. Досліджують відповідну кількість колоній; не має виявлятися забруднення бактеріофагами.

## АДЕНОВІРУСНІ ВЕКТОРИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

### ВИЗНАЧЕННЯ

Аденовірусні вектори для застосування людиною — ліофілізовані або рідкі препарати рекомбінантних аденовірусів, генетично модифікованих для перенесення генетичного матеріалу в людські соматичні клітини *in vivo* або *ex vivo*.

### ВИРОБНИЦТВО

#### СТРУКТУРА ВЕКТОРА

Існують різні підходи до дизайну і конструювання аденовірусного вектора. Мета клінічного застосування визначає оптимальний підхід. Вибирають метод, який мінімізує ризик утворення реплікативно-компетентних аденовірусних векторів, або метод, що ефективно видаляє віруси-хелпери, які можуть використовуватися у процесі виробництва.

#### ВИРОБНИЦТВО ВЕКТОРА

Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вектора відповідної якості. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вектор у кінцевому продукті від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж той, який використовувався для приготування вектора, що в клінічних випробуваннях продемонстрував задовільні результати з безпеки та ефективності.

Підходящими методами визначають генетичну і фенотипічну стабільність сконструйованого вектора, використовуваного при виробництві на рівні і після максимального рівня пасажу.

#### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВЕКТОРА

Вектор розмножують в безперервних клітинних лініях (5.2.3) на основі системи банку клітин. Час-

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

тога виникнення реплікативно-компетентних аденовірусів може бути значною, якщо існують великі гомологічні ділянки між вірусним геномом і геномом комплементарних клітин. Частоту виникнення реплікативно-компетентних аденовірусів можна знизити, мінімізуючи цю гомологію геномів. У виробництві рекомендується використовувати клітини, що не мають гомологічних послідовностей з вектором.

### ВЕКТОРНА ПОСІВНА СЕРІЯ

Виробництво вектора засноване на системі посівних серій.

Використаний штам аденовірусу слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним, особливо про видалені або модифіковані ділянки. Встановлюють детальний опис генетичної вставки/вставок і фланкуючих ділянок контролю, включаючи нуклеотидну послідовність. Документують метод введення генетичної вставки у вектор.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для виробництва вектора.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують у головній посівній серії та в кожній робочій посівній серії імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Генетичний і фенотипічний опис.** Проводять такі випробування:

- Увесь геном вектора на рівні пасажу, відповідного серії виробництва, секвенують і одержану аналітичними методами послідовність порівнюють із теоретичною послідовністю векторної конструкції і з наявними базами даних.
- Проводять рестрикційний аналіз векторної ДНК головної посівної серії, кожної робочої посівної серії і виробничої партії. Вірусну ДНК екстрагують, очищають і розщеплюють із достатнім розділенням (так, щоб отримані фрагменти можна було ідентифікувати електрофорезом) рестрикційними ферментами. Розщеплені фрагменти розділяють гель- або капілярним електрофорезом і отриманий набір рестрикційних фрагментів порівнюють із теоретичним, одержаним при конструюванні вектора.
- Досліджують відповідну кількість виділених субклонів на експресію генетично вставленого продукту (продуктів) і їх біологічну активність на рівні пасажу, відповідного серії виробництва. Субклони, що виявляють низький рівень експресії або біологічної активності, вимагають подальшого опису.

**Концентрація вектора.** Визначають титр інфекційного вектора або концентрацію векторних частинок у

головній посівній серії і в кожній робочій посівній серії.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Головна посівна серія і кожна робоча посівна серія мають витримувати випробування на сторонні агенти.

**Реплікативно-компетентні аденовіруси.** Реплікативно-компетентні аденовіруси утворюються гомологічною рекомбінацією між рекомбінантною вірусною ДНК і послідовністю аденовірусу, інтегрованою в геном клітин пакувальної лінії.

Визначення реплікативно-компетентних аденовірусів проводять підходящим методом, встановленим компетентним уповноваженим органом. Звичайно проводять визначення інфекційності на чутливих детекторних клітинних лініях, які не здатні бути комплементарними генам, видаленим із вектора. Можуть використовуватися інші підходящі індикатори реплікації.

Якщо у випробовуваних зразках передбачається відсутність реплікативно-компетентних аденовірусів, де можливо, дану векторну конструкцію і використовувані клітинні лінії проводять через не менше 2, а краще 3 або 4 послідовні пасажі на детекторних клітинних лініях. Виявлення цитопатичного ефекту в кінці пасажів вказує на наявність здатних реплікуватися аденовірусів у препараті. У кожне випробування включають позитивний контроль для контролю чутливості методу.

Коли у випробовуваних зразках очікується наявність реплікативно-компетентних аденовірусів, застосовують метод бляшкоутворення або метод обмежених розведень на детекторних клітинних лініях.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з клітинними культурами проводять на ділянці, де одночасно не обробляються інші клітини або вектори. Будь-який матеріал людського або тваринного походження має бути кваліфікований. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підходящі антибіотики в найменшій ефективній концентрації, але бажано у виробництві використовувати субстрат без антибіотиків. Якщо немає інших зазначень, на жодній стадії виробництва не використовують пеніцилін або стрептоміцин. Порцію культури клітин для виробництва відбирають окремо як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини).

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування очищеного збору.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Концентрація вектора.** Визначають титр інфекційного вектора і концентрацію векторних частинок в одиничному зборі.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини.** Контрольні клітини мають витримувати випробування на ідентифікацію (5.2.3) і випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### ОЧИЩЕНИЙ ЗБІР

Декілька одиничних зборів можна об'єднати перед процесами очищення. Процес очищення валідують для підтвердження задовільного видалення домішок.

Тільки очищені збори, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Цілісність геному.** Цілісність геному вектора перевіряють відповідними методами, такими як рестрикційний аналіз.

**Концентрація вектора.** Визначають титр інфекційного вектора або концентрацію векторних частинок в очищених зборах.

**Залишкові білки клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти підходящими імунохімічними методами (2.7.1) визначають вміст залишкових білків клітин-хазяїнів.

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти підходящими методами визначають вміст залишкової ДНК клітин-хазяїнів. Рекомендується використовувати кількісну ПЛР через специфічність і чутливість цього методу, але допускається застосування й інших підходящих методів.

**Залишкові реактиви.** Якщо в процесі очищення використовують реактиви, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід проводити випробування з виявлення цих речовин в очищеному зборі.

**Залишкові антибіотики.** Якщо в процесі виробництва використовують антибіотики, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід визначати залишкову кількість антибіотиків мікробіологічним випробуванням (адапованим загальним методом 2.7.2) або іншими підходящими методами (наприклад, рідинною хроматографією).

### КІНЦЕВИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ ПРОДУКТ

Декілька очищених зборів можуть бути об'єднані при приготуванні кінцевого нерозфасованого продукту. Можуть бути додані стабілізатори та інші допоміжні речовини. Приготований продукт фільтрують крізь бактеріальний фільтр.

Тільки кінцевий нерозфасований продукт, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцевий нерозфасований продукт має витримувати випробування на стерильність.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

Якщо випробування на альбумін бичачий сироватковий (якщо він був використаний при виробництві вектора) і реплікативно-компетентні аденовіруси були проведені на кінцевому нерозфасованому продукті й отримані задовільні результати, їх можна не проводити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Осмоляльність (2.2.35).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**pH (2.2.3).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Об'єм, що витягається (2.9.17).** Має витримувати випробування на об'єм, що витягається.

**Залишкова волога (2.5.12).** У межах, установлених для конкретного ліофілізованого препарату.

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше межі, встановленої для конкретного препарату, визначеної підходящим імунохімічним методом (2.7.1), якщо альбумін бичачий сироватковий був використаний при виробництві.

**Концентрація реплікативно-компетентних аденовірусів.** У межах, установлених для конкретного препарату.

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

**Векторні агрегати.** Визначають підходящими методами (наприклад, методом світлорозсіювання).

**Стерильність (2.6.1).** Препарат має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

**Термічна стабільність.** Зразки кінцевої серії вектора витримують при температурі і термінах зберігання, затверджених для конкретного препарату. Визначають загальний вміст інфекційного вектора після нагрівання, проведеного, як зазначено в розділі «Кількісне визначення». Паралельно визначають вміст вектора в ненагрітому зразку. Різниця концентрацій вектора в ненагрітому і нагрітому зразках має бути в межах, установлених для конкретного препарату.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Концентрація векторних частинок.** Підходять методом проводять фізичне титрування (наприклад, рідинною хроматографією, вимірюванням поглинання або МАНК (2.6.21)). Використовують підходящий стандартний препарат вектора для валідації кожного аналізу.

Концентрація векторних частинок у випробовуваному препараті має бути не менше зазначеної на етикетці.

**Інфекційний титр вектора.** Титрують випробовуваний препарат, інокуючи в культуру клітин. Титрують відповідний стандартний препарат вектора для валідації кожного визначення. Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) логарифма концентрації вектора більше значення, дозволеного компетентним уповноваженим органом;
- інфекційний титр вектора стандартного препарату виходить за межі значень, визначених для контрольної карти.

**Співвідношення концентрації векторних частинок і інфекційного титру вектора.** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Експресія продукту генетичної вставки.** Експресію продукту (продуктів) генетичної вставки визначають, де можливо, подальшою інокуляцією конкретного препарату зі заздалегідь встановленою множинністю зараження в клітинні культури підходящими імунохімічними методами (2.7.1), або біохімічними методами, або проточною цитометрією (2.7.24).

**Біологічна активність.** Якщо немає інших зазначень, біологічну активність визначають підходящими випробуваннями *in vitro* або *in vivo*.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- вміст діючих речовин;
- дозу, що рекомендується для застосування людиною, виражену в концентрації векторних частинок;
- для ліофілізованого препарату:
  - назву або склад і об'єм рідини, яку слід додати для розчинення;
  - термін придатності препарату після розчинення.

## ПОКСВІРУСНІ ВЕКТОРИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

### ВИЗНАЧЕННЯ

Поксвірусні вектори для застосування людиною — ліофілізовані або рідкі препарати рекомбінантних поксвірусів, генетично модифікованих для перенесення генетичного матеріалу в людські соматичні клітини *in vivo* або *ex vivo*.

### ВИРОБНИЦТВО

#### СТРУКТУРА ВЕКТОРА

У наш час дизайн поксвірусного вектора, як правило, проводять таким чином: генетична вставка вводиться нижче промотора поксвірусу. Ця експресійна касета вставляється в поксвірусний геном таким чином, що перериває несуттєвий для реплікації вірусний ген або розміщується між 2 відкритими рамками зчитування.

У більшості стратегій конструювання вектора експресійну касету насамперед вбудовують у цільовий сайт фрагмента вірусної ДНК, клонованого в бактеріальну плазмиду. Плазмиду потім вводять у культивовані *in vitro* клітини-хазяїна, одночасно інфіковані батьківським поксвірусом. Рекомбінація ДНК відбувається всередині інфікованих клітин між гомологічними послідовностями вірусного геному і вірусними послідовностями у плазміді так, щоб перенести генетичну вставку в цільові ділянки вірусного геному. Коректне вбудовування ДНК у потрібний сайт контролюють рестриктазним картуванням, МАНК (2.6.21) і секвенуванням. Для очищення рекомбінантного поксвірусу від суміші батьківських і рекомбінантних поксвірусів проводять послідовні стадії клонування бляшок. Використовують різні методи (наприклад, сторонні маркерні гени, гібридизацію ДНК, імунологічне визначення, фенотипічні зміни вірусу) для полегшення розпізнавання і/або відбору рекомбінантного поксвірусу від батьківських вірусів. Якщо тимчасово використовують сторонні маркерні гени, слід видалити їх із

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

кінцевого рекомбінантного поксвірусу підходими методами.

Альтернативна стратегія створення поксвірусного вектора починається з конструювання *in vitro* повно-розмірного вірусного геному, в якому міститься експресійна касета, поміщена у вибрану цільову ділянку. Цей рекомбінантний генотім вводиться в клітини-хазяїна, одночасно інфіковані хелперним поксвірусом, не здатним розмножуватися. Вірус-хелпер може бути поксвірусом того самого виду з інактивованою здатністю розмножуватися або іншим видом поксвірусу, який не може розмножуватися у клітинах-хазяїнах.

Конструювання нереплікативних поксвірусних векторів засноване на специфічних лініях клітин-хазяїнів, або первинних природно пермісивних клітинах, або лініях клітин-хазяїнів, які модифіковані так, щоб експресувати важливі поксвірусні гени. Ці клітини мають витримувати загальні вимоги з виробництва лікарських засобів (5.2.3), не допускається утворення реплікативних векторів.

### ВИРОБНИЦТВО ВЕКТОРА

Слід підтвердити, що спосіб виробництва призводить до стабільного виходу вектора відповідної якості. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вектор у кінцевому продукті від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж той, який використовувався для приготування вектора, що в клінічних випробуваннях продемонстрував задовільні результати з безпеки та ефективності.

Підходими методами визначають генетичну і фенотипічну стабільність сконструйованого вектора, використовуюваного при виробництві на рівні і після максимального рівня пасажу.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВЕКТОРА

Вектор розмножують в асептичних умовах у людських диплоїдних клітинах (5.2.3), в безперервних клітинних лініях (5.2.3) або в культурах курячих ембріональних клітин, отриманих із курячих згай, вільних від специфічних патогенів (5.2.2). Якщо вектор вирощений у безперервній клітинній лінії або в людських диплоїдних клітинах, закладають систему банку клітин.

### ВЕКТОРНА ПОСІВНА СЕРІЯ

Виробництво вектора засноване на системі посівних серій.

Штам використовуюваного поксвірусу ідентифікують архівними записами, які містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним, особливо про видалені або модифіковані ділянки. Ведуть детальний опис генетичної вставки/вставок і фланкуючих контролюючих ділянок, зокрема ну-

клеотидної послідовності. Документують метод введення генетичної вставки у вектор.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для виробництва вектора.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують у головній посівній серії і в кожній робочій посівній серії імунохімічними методами (2.7.1) або МАНК (2.6.21).

**Генетичний і фенотипічний опис.** Проводять такі випробування:

- Увесь генот вектора на рівні пасажу, відповідного серії виробництва, секвенують і визначену аналітичними методами послідовність порівнюють з теоретичною послідовністю векторної конструкції і з наявними базами даних.
- Проводять рестрикційний аналіз ДНК вектора головної посівної серії, кожної робочої посівної серії і виробничої партії. Вірусну ДНК екстрагують, очищають і розщеплюють так, щоб отримані фрагменти можна було ідентифікувати електрофорезом. Розщеплені фрагменти розділяють гель- або капілярним електрофорезом і отриманий набір рестрикційних фрагментів порівнюють з теоретичним, отриманим при конструюванні вектора.
- Досліджують відповідну кількість виділених субклонів на експресію продукту (продуктів) генетичної вставки і їх біологічну активність на рівні пасажу, відповідного виробничій партії. Субклони, що виявляють низький рівень експресії або біологічної активності, потребують подальшого опису.
- Клітини-хазяїнів контролюють визначенням реплікативних властивостей вектора і їх порівнянням із батьківським вірусом на рівні пасажу, відповідного виробничій партії.

**Інфекційний титр вектора.** Визначають інфекційний титр вектора в головній посівній серії і в кожній робочій посівній серії.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Головна посівна серія і кожна робоча посівна серія мають витримувати випробування на сторонні агенти, окрім тих випадків, коли штами, що володіють цитопатичною дією, не можуть бути нейтралізовані і вектор викликає інтерференцію. Якщо не можна провести випробування, проводять підходи альтернативні валідовані випробування.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять у зоні, де одночасно не обробляються інші клітини або вектори. Будь-який матеріал людського або тваринного походження має бути кваліфікований. Середовище для культивування клітин може містити індикатори рН, такі як



## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

феноловий червоний, і підходжі антибіотики в найменших ефективних концентраціях, але бажано у виробництві використовувати субстрат без антибіотиків. Якщо немає інших зазначень, на жодній стадії виробництва не використовують пеніцилін або стрептоміцин. Порцію культури клітин для виробництва відбирають окремо як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини).

Кожен одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування очищеного збору.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1) або МАНК (2.6.21).

**Інфекційний титр вектора.** Визначають інфекційний титр вектора в одиничному зборі.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати випробування на сторонні агенти, окрім тих випадків, коли штами, що володіють цитопатичною дією, не можуть бути нейтралізовані і вектор викликає інтерференцію. Якщо не можна провести випробування, проводять підходжі альтернативні валідовані випробування.

**Контрольні клітини.** Якщо при виробництві використовують людські диплоїдні клітини або безперервну клітинну культуру, контрольні клітини мають витримувати випробування на ідентифікацію (5.2.3). Вони мають витримувати випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### ОЧИЩЕНИЙ ЗБІР

Обробку проводять в асептичних умовах. Декілька одиничних зборів можна об'єднати до процесів очищення. Збір передусім очищають, видаляючи клітини, і потім, якщо застосовно, проводять очищення валідованими методами.

Тільки очищені збори, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1) або МАНК (2.6.21).

**Цілісність геному.** Цілісність геному вектора перевіряють підходжими методами, такими як рестрикційний аналіз.

**Інфекційний титр вектора.** Визначають інфекційний титр вектора в очищених зборах.

**Співвідношення інфекційного титру вектора і концентрації загального білка.** Визначають загальний вміст білків підходжим методом (2.5.33). Розраховують співвідношення інфекційного титру вектора і загальної концентрації білків.

**Залишкові білки клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти визначають вміст залишкових білків клітин-хазяїнів підходжими імунохімічними методами (2.7.1).

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти визначають вміст залишкової ДНК клітин-хазяїнів підходжими методами. Рекомендується використовувати кількісну ПЛР через свою специфічність і чутливість, але допускається застосування й інших підходжих методів.

**Залишкові реактиви.** Якщо в процесі очищення використовують реактиви, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід проводити випробування з виявлення цих речовин в очищеному зборі.

**Залишкові антибіотики.** Якщо в процесі виробництва використовують антибіотики, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід проводити визначення вмісту залишкових кількостей антибіотиків мікробіологічним аналізом (адаптованим загальним методом 2.7.2) або іншим підходжим методом (наприклад, рідинною хроматографією).

### КІНЦЕВИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ ПРОДУКТ

Декілька очищених зборів можуть бути об'єднані при приготуванні кінцевого нерозфасованого продукту. Можуть бути додані стабілізатори та інші допоміжні речовини.

Тільки кінцевий нерозфасований продукт, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцевий нерозфасований продукт має витримувати випробування на стерильність.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

Якщо випробування на альбумін бичачий сироватковий (якщо він був використаний при виробництві вектора) було проведено на кінцевому нерозфасованому продукті і отримані задовільні результати, випробування можна не проводити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1) або МАНК (2.6.21).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Осмоляльність** (2.2.35). У межах, установлених для конкретного препарату.

**pH** (2.2.3). У межах, установлених для конкретного препарату.

**Об'єм, що витягається** (2.9.17). Препарат має витримувати випробування на об'єм, що витягається.

**Залишкова волога** (2.5.12). У межах, установлених для конкретного ліофілізованого препарату.

**Альбумін бичачий сироватковий**. Не більше межі, встановленої для конкретного препарату, визначеної підходящим імунохімічним методом (2.7.1), якщо альбумін бичачий сироватковий був використаний при виробництві.

**Стерильність** (2.6.1). Препарат має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

**Термічна стабільність**. Зразки кінцевої серії вектора витримують при температурі і термінах зберігання, встановлених для конкретного препарату. Визначають загальний вміст інфекційного вектора після нагрівання, проведеного, як зазначено в розділі «Кількісне визначення». Паралельно визначають вміст вектора в ненагрітому зразку. Різниця концентрацій вектора в ненагрітому і нагрітому зразку має бути в межах, установлених для конкретного препарату.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Інфекційний титр вектора**. Титрують не менше 3 флаконів випробовуваного препарату, інокуючи в культуру клітин. Титрують відповідний стандартний препарат вектора для валідації кожного визначення.

Титр вектора у випробовуваному препараті має бути не менше мінімальної кількості, зазначеної на етикетці.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) логарифма концентрації вектора більше значення, дозволеного компетентним уповноваженим органом;
- інфекційний титр вектора стандартного препарату виходить за межі значень, визначених для контрольної карти.

**Експресія продукту генетичної вставки**. Експресію продукту (продуктів) генетичної вставки визначають, де можливо, подальшою інокуляцією конкретного препарату зі заздалегідь встановленою множинністю

зараження в клітинні культури, підходящими імунохімічними (2.7.1), або біохімічними методами або проточною цитометрією (2.7.24).

**Біологічна активність**. Якщо немає інших зазначень, біологічну активність визначають підходящими випробуваннями *in vitro* або *in vivo*.

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальний титр вектора на одну дозу для людини;
- дозу, що рекомендується для застосування людиною;
- для ліофілізованого препарату:
  - назву або склад і об'єм рідини, яку слід додати для розчинення;
  - термін придатності препарату після розчинення.

# ВЕКТОРИ НА ОСНОВІ РЕТРОВІРУСІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

## ВИЗНАЧЕННЯ

Вектори, отримані на основі ретровірусів для застосування людиною, є ліофілізованими або рідкими препаратами рекомбінантних ретровірусів, лентівірусів або спумавірусів, генетично модифікованих для перетворення їх у реплікативно-некомпетентні для перенесення генетичного матеріалу в людські соматичні клітини *in vivo* або *ex vivo*. Цей розділ стосується нереплікативних векторів.

## ВИРОБНИЦТВО

### СТРУКТУРА ВЕКТОРА

Типовий вектор складається із:

- мінімального геному батьківських вірусів, що містять структурні генетичні елементи, необхідні для виробництва вектора;
- необхідних регуляторних генетичних елементів для експресії генетичної вставки (наприклад, довгі кінцеві повтори (ДКП, LTRs));
- генетичних вставок.

Дизайн векторної конструкції має запобігати утворенню здатних реплікуватися вірусів.

### ВИРОБНИЦТВО ВЕКТОРА

Слід підтвердити, що спосіб виробництва призводить до стабільного виходу вектора відповідної

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

якості. Якщо немає інших зазначень і дозволів, пакувальні або продукуючі клітини мають пройти не більше подвоєнь клітин від головного банку клітин (МСВ), ніж ті, які використовувалися для приготування вектора, що в клінічних випробуваннях продемонстрував задовільні результати з безпеки та ефективності.

Підходими методами визначають генетичну і фенотипічну стабільність сконструйованого вектора, використовуюваного при виробництві на рівні і після максимального рівня пасажу.

Вектори вирощують в безперервних клітинних лініях (5.2.3), використовуючи системи банку клітин. У виробництві можуть використовуватися або стабільні, або транзиторні трансфіковані клітини.

### Визначення

**Пакувальні клітини** – початкова лінія клітин, стабільно трансфікована плазмідями, що містять вірусні гени, необхідні для виробництва порожніх векторних частинок: *gag, pol, env*.

**Клітини-продуценти** – містять вірусні гени й експресійні касети, необхідні для виробництва вектора.

- У системі стабільного напрацювання клітини-продуценти утворюються стабільною трансфекцією пакувальної клітинної лінії шляхом перенесення плазмід, яка містить послідовність, що інтересує.
- У системі транзиторного напрацювання клітини-продуценти утворюються в ході виробництва одночасною трансфекцією початкових клітинних ліній як вірусними генами, так і трансгенною експресійною плазмідною або транзиторною трансфекцією клітин пакувальної лінії шляхом перенесення плазмід, яка містить послідовність, що інтересує.

### Проміжні продукти виробництва

#### Пакувальні клітини

**Кількість копій.** З певної кількості клітин виділяють і очищають ДНК геному і підходими методами, такими як кількісна ПЛР (2.6.21), визначають кількість копій генів *gag, pol* і *env*.

**Цілісність послідовності вірусних генів.** Проводять повне секвенування вбудованих вірусних генів і їхніх регуляторних елементів.

**Генетична стабільність.** Генетичну стабільність пакувальних клітин перевіряють на рівні або вище максимальної кількості подвоєнь клітин, використовуваних для виробництва.

#### Плазмідни

Для виробництва векторів необхідне застосування проміжних плазмід. Для кожної плазмідної ДНК,

використаної при виробництві, проводять повний опис, що включає ідентифікацію, джерело, способи виділення і нуклеотидну послідовність. Документують джерело і функції складових частин цих плазмід, таких як ділянки початку реплікації, вірусні й еукаріотичні промотори і гени, що кодують маркери селекції.

Виробництво проміжних плазмід засноване на системі банку бактеріальних клітин. Головний банк клітин (МСВ) має відповідати вимогам, наведеним у розділі «Бактеріальні клітини, використовувані для виробництва плазмідних векторів для застосування людиною». Плазмідни очищають підходими методами.

Тільки серії плазмід, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для виробництва вектора.

**Ідентифікація.** Плазмідни ідентифікують рестрикційним аналізом, секвенуванням або МАНК (2.6.21).

**Цілісність геному.** Цілісність геному перевіряють підходими методами, такими як рестрикційний аналіз вірусних генів, генетичних вставок і їх відповідних регуляторних елементів.

**Плазмідна ДНК.** Наступні зазначення наведені як приклади.

Концентрацію ДНК більше 500 нг/мл визначають вимірюванням поглинання за довжини хвилі 260 нм. Оптичне поглинання розчину, що містить 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК, дорівнює 1 (питоме поглинання — 200).

Концентрацію ДНК менше 500 нг/мл визначають подальшою інкубацією із флуоресцентними барвниками, які специфічно зв'язуються із дволанцюговими ДНК, використовуючи стандартний препарат ДНК для побудови калібрувальної кривої.

Для визначення концентрації плазмідної ДНК також можна застосовувати рідинну хроматографію, використовуючи стандартний препарат. У деяких випадках також застосовний капілярний електрофорез.

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Вміст залишкових кількостей ДНК клітин-хазяїнів визначають, використовуючи підходи аналітичні методи, поки процес не валідований і не підтверджена відповідна чистота. Рекомендується використання методу кількісної ПЛР через її чутливість і специфічність, але допускається застосування й інших підходящих методів.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

**Стерильність (2.6.1).** Має витримувати випробування на стерильність.

*Клітини-продуценти, використовувани в системі стабільного напрацювання*

**Кількість копій.** Підходящим методом визначають кількість копій інтегрованих вірусних генів і експресійної касети.

**Генетична стабільність.** Підтверджують генетичну стабільність клітин-продуцентів на рівні або вище рівня максимальної кількості подвоєння клітин, використовуваних у процесі виробництва.

**Цілісність послідовності вірусних генів і експресійної касети.** Проводять повне секвенування вбудованих вірусних генів, експресійної касети та їхніх регуляторних елементів (наприклад, LTRs, промоторів, psi-послідовностей, сигналу поліаденілування).

**Реплікативно-компетентні віруси.** Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять підходящим методом. Визначення може ґрунтуватися на сумісному культивуванні декількох клітинних подвоєнь клітин-продуцентів з пермісивною клітинною лінією з подальшим визначенням (або шляхом спостереження цитопатичного або гемоадсорбуючого ефекту на індикаторних клітинах типу PG4 S+L-, або детекцією МАНК (2.6.21) з використанням індикаторних клітинних ліній, або методом порятунку генетичного маркера). У кожне визначення включають позитивні контролю для перевірки чутливості методу. Не мають виявлятися реплікативно-компетентні віруси.

### ВИРОБНИЦТВО І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять на ділянці з відповідним рівнем контамінації, де одночасно не обробляються інші клітини або вектори. Будь-який матеріал людського або тваринного походження, використовуваний у приготуванні клітинної суспензії і середовища для культивування, має бути кваліфікований. Бажано у виробництві використовувати субстрат без антибіотиків. Якщо немає інших зазначень або дозволів, на жодній стадії виробництва не використовують пеніцилін або стрептоміцин.

Кожен одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування очищеного збору.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Концентрація вектора.** Визначають інфекційний титр вектора і/або концентрацію векторних частинок в одиничному зборі.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Кожен одиничний збір має витримувати випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини.** При використанні транзитornoї системи напрацювання контрольні клітини мають

витримувати випробування на ідентифікацію (5.2.3) і випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### ОЧИЩЕНИЙ ЗБІР

Декілька одиничних зборів можна об'єднати до процесів очищення.

Тільки очищені збори, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Цілісність геному.** Цілісність геному вектора перевіряють підходящими методами.

**Концентрація вектора.** Визначають титр інфекційного вектора або концентрацію векторних частинок підходящим методом, наприклад зараженням пермісивних клітин, з подальшим кількісним визначенням МАНК (наприклад, кількісна ПЛР), Саузерн-блотинг аналізом або аналізом експресії білка. Для лентивірусних векторів фізичний титр вимірюють, наприклад, ELISA (р24).

**Реплікативно-компетентні віруси.** Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять підходящими методами. Звичайно проводять ампліфікацію на пермісивних клітинах з подальшим визначенням МАНК (2.6.21), визначенням вірусного антигена (наприклад, визначення р24 імуноферментним методом ELISA) або методом порятунку генетичного маркера. У кожне визначення включають позитивні контролю для контролю чутливості методу.

Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять на очищеному зборі або в кінцевій серії. Не мають виявлятися віруси, здатні реплікуватися.

**Залишкові білки клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти, визначають вміст залишкових білків клітин-хазяїнів підходящими імунохімічними методами (2.7.1).

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти підходящими методами визначають вміст залишкової ДНК клітин-хазяїнів. Рекомендується використовувати кількісну ПЛР через її специфічність і чутливість, але допускається застосування й інших підходящих методів.

**Залишкові реактиви.** Якщо в процесі очищення використовують реактиви, поки процес не валідований і не підтверджена чистота в очищеному зборі, слід проводити випробування (наприклад, рідинну хроматографію або атомно-адсорбційну спектроскопію) для виявлення цих речовин.

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

**Залишкові антибіотики.** Якщо в процесі виробництва використовують антибіотики, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід проводити визначення вмісту залишкових кількостей антибіотиків мікробіологічним аналізом (адаптованим загальним методом 2.7.2) або іншим підходящим методом.

**Залишкові плазмід.** При використанні транзитornoї системи напрацювання слід визначити концентрацію залишкових контамінуючих плазмід.

### КІНЦЕВИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ ПРОДУКТ

Декілька очищених зборів можуть бути об'єднані при приготуванні кінцевого нерозфасованого продукту. Можуть бути додані стабілізатори і інші допоміжні речовини.

Тільки кінцевий нерозфасований продукт, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцевий нерозфасований продукт має витримувати випробування на стерильність.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

Якщо випробування на альбумін бичачий сироватковий (якщо він був використаний при виробництві вектора) було проведене на кінцевому нерозфасованому продукті та отримані достовірно задовільні результати, його можна не проводити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Осмоляльність (2.2.35).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**pH (2.2.3).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Об'єм, що витягається (2.9.17).** Препарат має витримувати випробування на об'єм, що витягається.

**Залишкова волога (2.5.12).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше межі, встановленої для конкретного препарату, визначеної підходящим імунохімічним методом (2.7.1), якщо альбумін бичачий сироватковий був використаний при виробництві.

**Реплікативно-компетентні віруси.** Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять підходящими методами. Звичайно проводять ампліфікацію на пермісивних клітинах з подальшим визначенням МАНК (2.6.21), визначенням вірусного антигена (наприклад, визначення р24 імуноферментним методом ELISA) або методом порятунку генетичного маркера. У кожне визначення включають позитивні контролі для контролю чутливості методу.

Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять на очищеному зборі або в кінцевій серії. Не мають виявлятися реплікативно-компетентні віруси.

**Стерильність (2.6.1).** Мають витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Концентрація векторних частинок.** Проводять фізичне титрування підходящим методом (наприклад, імунохімічними методами (2.7.1) або МАНК (2.6.21)). Використовують підходящий стандартний препарат вектора для валідації кожного аналізу.

**Інфекційний титр вектора.** Титрують випробовуваний препарат інокуляцією в культуру клітин. Титрують відповідний стандартний препарат вектора для валідації кожного визначення.

Інфекційний титр вектора у випробовуваному препараті має бути не менше зазначеного на етикетці.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) логарифма концентрації більше значення, дозволеного компетентним уповноваженим органом;
- інфекційний титр вектора стандартного препарату виходить за межі значень, визначених для контрольної карти.

**Співвідношення концентрації векторних частинок і інфекційного титру вектора.** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Експресія продукту генетичної вставки.** Експресію продукту/продуктів генетичної вставки визначають, де можливо, подальшою інокуляцією конкретного препарату із задалегідь встановленою множинністю зараження в клітинні культури підходящими імуно-

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

хімічними (2.7.1) або біохімічними методами або проточною цитометрією (2.7.24).

**Біологічна активність.** Якщо немає інших зазначень, біологічну активність визначають підхожими випробуваннями *in vitro* або *in vivo*.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальний титр вектора на одну дозу для людини;
- дозу, що рекомендується для застосування людиною;
- для ліофілізованого препарату:
  - назва або склад і об'єм рідини, яку слід додати для розчинення;
  - термін придатності препарату після розчинення.

## АДЕНОАСОЦІЙОВАНІ ВІРУСНІ ВЕКТОРИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

### ВИЗНАЧЕННЯ

Аденоасоційовані вірусні (AAV) вектори для застосування людиною є ліофілізованими або рідкими препаратами рекомбінантних AAV (гAAV), генетично модифікованих для перенесення генетичного матеріалу в людські соматичні клітини *in vivo* або *ex vivo*.

### ВИРОБНИЦТВО

#### СТРУКТУРА ВЕКТОРА

гAAV вектори розробляються заміщенням *rep* і *cap* генів генетичною вставкою, що інтересує. Послідовності інвертованих кінцевих повторів (ІКП, ITR) зберігаються в гAAV векторі, оскільки вони єдині послідовності AAV, які абсолютно необхідні *in cis* для функціонування як початок реплікації. *rep* і *cap* гени потрібні *in trans*, і вони діють для реплікації й упакування відповідно. Отже, гAAV вектор містить ITR-и та генетичну вставку.

Дикий тип AAV нормально реплікується тільки за наявності хелперних функцій, що забезпечуються коінфікуванням аденовірусом або вірусом герпесу. Таким чином, існують різні підходи виробництва AAV вектора. Вибір стратегії виробництва розробляється з метою мінімізувати ризик утворення реплікативно-компетентних AAV векторів і ефективно видаляти хелперні віруси, які можуть використовуватися при виробництві.

### ВИРОБНИЦТВО ВЕКТОРА

Слід підтвердити, що спосіб виробництва призводить до стабільного виходу вектора відповідної якості та стабільності.

У наш час використовують декілька стратегій отримання AAV векторів, наприклад:

- транзйентну котрансфекцію клітинних ліній плазмдами, що містять ITR-и і генетичну вставку, *rep* і *cap* гени і хелперні функції;
- інфікування не здатним реплікуватися хелперним вірусом лінії клітин-продуцентів, що несуть *rep* і *cap* гени, ITR-и і генетичну вставку;
- інфікування пермісивної клітинної лінії одним або декількома вірусами виробництва, кодуєчими *rep* і/або *cap* і/або генетичну вставку і ITR-и, і які можуть або не можуть забезпечити хелперні функції (віруси-хелпери і бакуловіруси відповідно).

Залежно від стратегії, використовуваної при виробництві AAV вектора, потрібні різні проміжні продукти (плазмиди, віруси, використовувані для виробництва, пакувальні клітини).

Виникнення реплікативно-компетентних AAV може бути істотним, коли є багато гомологічних ділянок між геномами проміжних продуктів виробництва і гAAV вектором. Це можна мінімізувати шляхом максимального зменшення гомології між геномами. Рекомендується у виробництві використовувати проміжні продукти, що не мають гомологічних послідовностей.

За допомогою підхожих методів визначають генетичну і фенотипічну стабільність вектора на або вище рівня максимальної кількості пасажів, використаних при виробництві.

#### Проміжні продукти виробництва

Віруси, використовувані при виробництві, і гAAV вектор виробляють у безперервних клітинних лініях (5.2.3), використовуючи систему посівних серій і систему банку клітин.

#### Пакувальні та продукуючі клітини

**Кількість копій.** З певної кількості клітин виділяють і очищують ДНК геному і підхожими методами, такими як кількісна ПЛР (2.6.21), визначають кількість копій введених вірусних генів і експресійної касети.

**Цілісність послідовності вірусних генів і експресійних касет.** Проводять повне секвенування вбудованих вірусних генів, їхніх регуляторних елементів і, де застосовно, експресійної касети.

**Генетична стабільність.** Генетичну стабільність клітин перевіряють на рівні або вище максимальної кількості подвоєнь клітин, використаних для виробництва.

## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

**Дикі види AAV.** Відсутність диких видів AAV перевіряють, використовуючи МАНК (2.6.21).

### Плазмід

Виробництво AAV вектора транз'єнтною котрансфекцією вимагає застосування проміжних плазмід. Для кожної плазмідної ДНК, використаної при виробництві, проводять повний опис, що включає ідентифікацію, джерело, шляхи виділення і нуклеотидну послідовність. Документують джерело і функції складових частин плазмід, таких як ділянка початку реплікації, вірусні й еукаріотичні промотори і гени, що кодують маркери селекції.

Виробництво проміжних плазмід засноване на системі банку бактеріальних клітин. Головний банк клітин (МСВ) має витримувати вимоги, наведені в розділі «Бактеріальні клітини, використовувані для виробництва плазмідних векторів для застосування людиною». Плазмід очищають підходящими методами.

Тільки серії плазмід, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для виробництва AAV вектора.

**Ідентифікація.** Плазмід ідентифікують рестрикційним аналізом, секвенуванням або МАНК (2.6.21).

**Цілісність геному.** Цілісність геному перевіряють підходящими методами, такими як рестрикційний аналіз ділянок, відповідних *rep*, *cap* і експресійній касеті.

**Плазмідна ДНК.** Наступні зазначення наведені як приклади.

Концентрацію ДНК більше 500 нг/мл визначають вимірюванням поглинання за довжини хвилі 260 нм. Оптичне поглинання розчину, що містить 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК, дорівнює 1 (питоме поглинання — 200).

Концентрацію ДНК менше 500 нг/мл визначають подальшою інкубацією із флуоресцентними барвниками, які специфічно зв'язуються із дволанцюговими ДНК, використовуючи стандартний препарат ДНК для побудови калібрувальної кривої.

Для визначення концентрації плазмідної ДНК також можна застосовувати рідинну хроматографію, використовуючи стандартний препарат. У деяких випадках також застосовний капілярний електрофорез.

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Вміст залишкових кількостей ДНК клітин-хазяїнів визначають, використовуючи підходи аналітичні методи, поки процес не валідований і не підтверджена відповідна чистота. Рекомендується використання методу кількісної ПЛР через її чутливість і специфічність, але допускається застосування й інших підходящих методів.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

**Стерильність (2.6.1).** Мають витримувати вимоги щодо стерильності.

### Віруси, використовувані у виробництві

Виробництво вірусів засноване на системі посівних серій і банку клітин або, де застосовно (наприклад, для бакуловірусів), на транз'єнтних системах. Штам вірусу ідентифікують архівними записами, що включають інформацію про його походження і подальші маніпуляції із ним, особливо про видалені або модифіковані ділянки. Документують нуклеотидну послідовність вірусів.

Тільки віруси, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися.

**Ідентифікація.** Віруси, використовувані у виробництві, ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Цілісність геному.** Цілісність геному вірусу, використовуваного у виробництві, перевіряють підходящими методами, такими як рестрикційний аналіз. Якщо віруси модифіковані для експресії *rep* або *cap* генів або експресійної касети, цілісність геному визначають секвенуванням або кількісною ПЛР цих ділянок.

**Генетична стабільність.** При використанні системи стабільного напрацювання підтверджують генетичну стабільність на рівні або вище рівня максимальної кількості подвоєння клітин, використовуваних у процесі виробництва.

**Титр вірусу.** Титр вірусу визначають підходящим методом.

**Дикий тип AAV.** Де застосовно, перевіряють відсутність дикого типу AAV у посівних серіях хелперного вірусу, використовуючи МАНК (2.6.21).

**Реплікативно-компетентні віруси.** Визначення реплікативно-компетентних вірусів проводять підходящими методами. Не мають виявлятися реплікативно-компетентні віруси.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Мають витримувати випробування на сторонні агенти. Крім того, де застосовно, необхідно провести визначення потенційного забруднення специфічними вірусами комах.

### ВИРОБНИЦТВО І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять на ділянці з відповідним рівнем контамінації, де одночасно не обробляються інші клітини, віруси або вектори. Будь-який матеріал людського або тваринного походження, використовуваний у приготуванні клітинної сус-

пензії і середовища для культивування, має бути кваліфікований. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, і підхожі антибіотики в найменших ефективних концентраціях. Бажано у виробництві використовувати субстрат без антибіотиків. Якщо немає інших зазначень або дозволів, на жодній стадії виробництва не використовують пеніцилін або стрептоміцин. Порцію культури клітин для виробництва відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини).

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування очищеного збору.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Концентрація вектора.** Визначають інфекційний титр вектора або концентрацію векторних частинок в одиничному зборі.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини.** Якщо для виробництва використовують клітинні лінії комах, контрольні клітини мають витримувати випробування на ідентифікацію (5.2.3) і випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### ОЧИЩЕНИЙ ЗБІР

Декілька одиничних зборів можна об'єднати до процесів очищення. Процес очищення валідують для підтвердження задовільного видалення домішок.

Тільки очищені збори, що витримують наведені нижче вимоги, можуть використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Ідентифікація.** Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

**Генетичні характеристики.** Проводять такі випробування:

- Увесь геном вектора протягом відповідної кількості виробничих циклів на рівні очищеного збору або кінцевої серії секвенують і отриману аналітичну послідовність порівнюють з теоретичною послідовністю векторної конструкції і з наявними базами даних.
- Цілісність геному перевіряють на ДНК вектора. Можна використовувати ПЛР аналіз.

**Концентрація вектора.** Визначають інфекційний титр вектора і концентрацію векторних частинок.

**Залишкові віруси, використовувані у виробництві.** Залишкові віруси, використовувані у виробництві, ви-

значають методом бляшкоутворення або методом визначення дози інфекційного агента, що інфікує 50 % клітинної культури (TCID<sub>50</sub>) на пермісивних клітинних лініях, або кількісною ПЛР, відповідно до використаної системи виробництва.

**Залишкові білки.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти підхожими імунохімічними методами (2.7.1) визначають вміст залишкових білків клітин-хазяїнів і/або вірусних білків.

**Залишкова ДНК.** Поки процес не валідований, для підтвердження чистоти підхожими методами визначають вміст залишкової ДНК клітин-продуцентів і залишкової ДНК проміжних продуктів, таких як плазміди і, де застосовно, вірусів, використовуваних у виробництві. Рекомендується використовувати кількісну ПЛР через її специфічність й чутливість, але допускається застосування й інших підхожих методів.

**Залишкові реактиви.** Якщо в процесі очищення використовують реактиви, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, в очищеному зборі слід проводити випробування для виявлення цих речовин.

**Залишкові антибіотики.** Якщо в процесі виробництва використовують антибіотики, поки процес не валідований і не підтверджена чистота, слід визначати залишкову кількість антибіотиків мікробіологічним випробуванням (адаптованим загальним методом 2.7.2) або іншими підхожими методами.

### КІНЦЕВИЙ НЕРОЗФАСОВАНИЙ ПРОДУКТ

Декілька очищених зборів можуть бути об'єднані при приготуванні кінцевого нерозфасованого продукту. Можуть бути додані стабілізатори і інші допоміжні речовини. Приготований продукт фільтрують крізь бактеріальний фільтр.

Тільки кінцевий нерозфасований продукт, що витримує наведені нижче вимоги, може бути використаний для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцевий нерозфасований продукт має витримувати випробування на стерильність.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

Якщо випробування на альбумін бичачий сироватковий (якщо він був використаний при виробництві вектора) і реплікативно-компетентні ААV були проведені на кінцевому нерозфасованому продукті



## 5.14. Лікарські засоби, переносники генів, для застосування людиною

і отримані задовільні результати, їх можна не проводити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вектор ідентифікують імунохімічними методами (2.7.1), МАНК (2.6.21) або рестрикційним аналізом.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Осмоляльність (2.2.35).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**pH (2.2.3).** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Об'єм, що витягається (2.9.17).** Препарат має витримувати випробування на об'єм, що витягається.

**Залишкова волога (2.5.12).** У межах, установлених для конкретного ліофілізованого препарату.

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше межі, встановленої для конкретного препарату, визначеної підходящим імунохімічним методом (2.7.1), якщо альбумін бичачий сироватковий був використаний при виробництві.

**Концентрація реплікативно-компетентних AAV.** У межах, установлених для конкретного препарату.

Визначення реплікативно-компетентних AAV проводять реплікаційним аналізом на пермісивних клітинних лініях, заздалегідь інфікованих хелперним вірусом, і аналізом реплікативних форм Саузерн-блотингом на низькомолекулярній ДНК або детекцією *rep* генів кількісної ПЛР.

**Векторні агрегати.** Визначають підходящими методами (наприклад, світлорозсіюванням).

**Стерильність (2.6.1).** Препарат має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше межі, встановленої для конкретного препарату.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Концентрація векторних частинок.** Концентрацію векторних частинок визначають підходящими методами,

такими як кількісна ПЛР, порівнюючи зі стандартною кривою, отриманою з використанням рекомбінантної AAV плазмиди або стандартного препарату AAV.

Концентрація векторних частинок у випробовуваному препараті має бути не менше зазначеної на етикетці.

**Інфекційний титр вектора.** Титрують випробовуваний препарат, інокуючи в культуру клітин. Титрують відповідний стандартний препарат вектора для валідації кожного визначення.

Інфекційний титр вектора у випробовуваному препараті має бути не менше мінімальної кількості, зазначеної на етикетці.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) логарифма концентрації більше значення, дозволеного компетентним уповноваженим органом;
- інфекційний титр вектора стандартного препарату виходить за межі значень, визначених для контрольної карти.

**Співвідношення концентрації векторних частинок і інфекційного титру вектора.** У межах, установлених для конкретного препарату.

**Експресія продукту генетичної вставки.** Експресію продукту/продуктів генетичної вставки визначають, де можливо, подальшою інокуляцією конкретного препарату із заздалегідь встановленою множинністю зараження в клітинні культури підходящими імунохімічними (2.7.1) або біохімічними методами або проточною цитометрією (2.7.24).

**Біологічна активність.** Якщо немає інших зазначень і дозволів, біологічну активність визначають підходящими випробуваннями *in vitro* або *in vivo*.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- вміст діючих речовин;
- дозу, що рекомендується для застосування людиною;
- для ліофілізованого препарату:
  - назва або склад і об'єм рідини, яку слід додати для розчинення;
  - термін придатності препарату після розчинення.

## 5.N.1. Екстемпоральні лікарські засоби

### 5.N.1. ЕКСТЕМПОРАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

#### 5.N.1.4. ПОРОШКИ ЕКСТЕМПОРАЛЬНІ

#### Pulveres ex tempore

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Порошки екстемпоральні являють собою лікарські форми, що складаються із твердих окремих сухих частинок різного ступеня здрібненості, приготовані в аптечних умовах. Вони мають відповідати вимогам статті «5.N.1.1. Екстемпоральні нестерильні лікарські засоби».

Порошки, виготовлені екстемпорально, можуть бути класифіковані як:

- порошки для зовнішнього застосування;
- порошки для орального застосування.

Порошки екстемпоральні для зовнішнього й орального застосування мають відповідати вимогам загальних статей «Порошки для зовнішнього застосування» та «Порошки для орального застосування», відповідно.

#### ВИГОТОВЛЕННЯ

Спосіб виготовлення (технологію) порошоків екстемпоральних підбирають з урахуванням їх медичного призначення, складу рецептурного пропису, кількостей і фізико-хімічних властивостей субстанцій (агрегатний стан, густина, колір, запах тощо). Субстанції (діючі та допоміжні речовини), що використовують для приготування порошоків екстемпоральних, мають відповідати вимогам окремих статей ДФУ або, за їх відсутності, вимогам діючих нормативних документів.

Ступінь здрібнення субстанцій залежить від способу застосування порошоків. Якщо немає інших зазначень, субстанції для виготовлення порошоків здрібнюють на відповідному обладнанні:

- для порошоків для зовнішнього застосування: пудр (присипок) — до дуже дрібного порошку (2.9.12), для назальних порошоків — до середньо-дрібного порошку (2.9.12);
- для порошоків для орального застосування — до дрібного порошку (2.9.12).

Субстанції порошоків для приготування розчинів допускається не здрібнювати, якщо підтверджено, що розмір їх частинок не впливає на розчинність.

Субстанції, що мають приблизно однакові фізико-хімічні властивості, здрібнюють і змішують відповідно до їх кількісного співвідношення, величини втрат

на розтирання у ступці, індиферентних допоміжних речовин (наприклад, цукру, глюкози, що завжди поміщають у ступку першими).

Якщо субстанції прописані у рецепті у кількісному співвідношенні понад 1:5, першою розтирають субстанцію, що входить до складу лікарського засобу у більшій кількості або має менші втрати при розтиранні у ступці, після чого змішування субстанцій проводять у порядку їх кількостей (від меншої до більшої).

Субстанції з різними фізико-хімічними властивостями здрібнюють і змішують у такому порядку: крупнокристалічні, дрібнокристалічні; аморфні речовини та речовини, що легко розпилюються, додають в останню чергу.

Виготовлення порошоків екстемпоральних з отруйними та наркотичними (психотропними) речовинами виконують згідно із правилами роботи із цими речовинами, що викладені у чинних нормативних документах.

Отруйні, наркотичні (психотропні) та сильнодіючі речовини додають у ступку, попередньо затерту індиферентною речовиною або речовиною, прописаною у рецепті у більшій кількості.

Отруйні та сильнодіючі речовини у кількостях менше 0.05 г на всю масу, що готується, використовують у вигляді тритурації — суміші з лактозою та іншими допоміжними речовинами (1:100 або 1:10).

За наявності у прописі цукру його масу слід зменшити на масу тритурації.

Барвні речовини перед початком змішування поміщають між двома шарами незабарвленої речовини або суміші незабарвлених речовин.

Субстанції, що важко подрібнюються, здрібнюють у присутності 96 % спирту або ефіру. Пахучі лікарські речовини здрібнюють у ступці, затертій речовиною, що не має запаху. Леткі лікарські речовини додають в останню чергу.

При виготовленні порошоків з екстрактами враховують консистенцію екстракту. Наприклад, густий екстракт беладонни (1:1) додають у прописаній у рецепті кількості, сухий екстракт беладонни (1:2) і розчин густого екстракту беладонни (1:2) додають у подвійній кількості від прописаного у рецепті.

Введення до складу порошоків рідких інгредієнтів (настойок, ефірних олій тощо) не має змінювати плинність порошку (2.9.36).

Розрізняють порошки: прості, що складаються з однієї речовини; складні, що складаються із двох або більше речовин.

Складні порошки готують з урахуванням властивостей діючих, допоміжних речовин та їхніх кількостей. При наявності у складі складного порошку речовин у різних кількостях змішування починають з речовин, що входять у менших кількостях, поступово додаючи решту речовин.

Напівфабрикати додають до інших інгредієнтів відповідно до рецептурного пропису за правилами здрібнення та змішування складних порошків.

#### ВИПРОБУВАННЯ

Згідно з вимогами статті «5.N.1.1. Екстемпоральні нестерильні лікарські засоби» та статей «Порошки для зовнішнього застосування» або «Порошки для орального застосування», відповідно.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Вміст визначуваних речовин виражають у грамах, міліграмах або одиницях дії (ОД) в одній дозі, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Відхилення у вмісті діючих речовин мають становити при дозуванні менше 100 мг ( $\pm 15\%$ ), більше 100 мг ( $\pm 10\%$ ) від вмісту, зазначеного у розділі «Склад», якщо немає інших зазначень.

#### УПАКОВКА, МАРКУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Згідно з вимогами статті «5.N.1.1. Екстемпоральні нестерильні лікарські засоби» або інших чинних нормативних документів.

# **ЗАГАЛЬНІ МОНОГРАФІЇ**



# ЛІКАРСЬКА РОСЛИННА СИРОВИНА

## Plantae medicinales

### ВИЗНАЧЕННЯ

Лікарська рослинна сировина — переважно цілі, фрагментовані або ламані рослини, частини рослин, водорості, гриби, лишайники у необробленому, звичайно висушеному, іноді свіжому вигляді. Деякі ексудати, що не були піддані спеціальній обробці, також є лікарською рослинною сировиною. Назва рослинної сировини точно визначається ботанічною науковою назвою вихідної рослинної сировини згідно з біноміальною системою (рід, вид, тип, автор).

▼ *Ціла* — лікарська рослинна сировина, висушена або невисушена в тому вигляді, в якому і зібрана — не змінена в розмірах; наприклад, шипшина собача, гіркий фенхель, солодкий фенхель, римської ромашки квітки.

*Фрагментована* — лікарська рослинна сировина, розміри якої зменшені після збору для зручності обробки, сушіння і/або упакування: наприклад, хінного дерева кора, ревінь, пасифлори квітки.

*Ламана* — лікарська рослинна сировина, в якій крихкіші частини рослини поламані під час сушіння, упакування або транспортування: наприклад, беладони листя, ромашки квітки, хмелю шишки.

*Різана* — лікарська рослинна сировина, розміри якої зменшені, але не до стану порошку, для якого проведення макроскопічних досліджень, наведених в окремій статті, не можливе. Якщо лікарську рослинну сировину ріжуть спеціально, щоб вона була однорідною, наприклад, для лікарських рослинних чаїв, це — лікарський рослинний препарат. Різана лікарська сировина певних видів може бути описана в окремій статті.

Якщо немає інших зазначень, лікарська рослинна сировина, що витримує вимоги окремої статті та потім різана для екстракції, має витримувати вимоги цієї самої статті, окрім макроскопічного опису.

Термін «лікарська рослинна сировина» є синонімом терміну «лікарська рослинна субстанція», що використовується в законодавчих актах Європейського Союзу з лікарських рослинних продуктів.▲

### ВИРОБНИЦТВО

Лікарську рослинну сировину одержують культивуванням або збором дикорослих рослин. Для гарантії якості рослинної сировини суттєвими є належні умови культивування, збору, сортування, сушіння, здрібнення та зберігання.

Лікарська рослинна сировина має бути, по можливості, вільною від забруднень, таких як ґрунт, пил, сміття, а також грибів, комах та інших забруднень тваринного походження. У сировині не мають виявлятися ознаки гниття.

Якщо проводилася деконтамінація, слід показати, що компоненти рослинної сировини не пошкоджені і що в сировині не залишилося шкідливих домішок. При проведенні деконтамінації лікарської рослинної сировини забороняється застосування етиленоксиду.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Лікарську рослинну сировину ідентифікують, використовуючи її макроскопічні і, мікроскопічні характеристики, а також інші необхідні випробування (наприклад, тонкошарову хроматографію).

### ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Якщо немає інших зазначень і дозволів, проводять випробування на вміст сторонніх домішок. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вміст сторонніх домішок не має перевищувати 2 % (м/м). Лікарська рослинна сировина, яка може бути фальсифікована, повинна піддаватися відповідним специфічним випробуванням.▼ Випробування на сторонні домішки не можливо провести для різаної лікарської рослинної сировини, якщо вона різана для специфічних цілей або для екстракції, як зазначено в розділі «Визначення». В цьому випадку припускається, що різана сировина витримує вимоги на сторонні домішки, якщо до різання сировина витримувала ці вимоги.▲

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Якщо немає інших зазначень і дозволів, визначають втрату в масі при висушуванні.

**Вода (2.2.13).** Для лікарської рослинної сировини з високим вмістом ефірних олій замість втрати в масі при висушуванні проводять визначення води.

**Пестициди (2.8.13).** Лікарська рослинна сировина має відповідати вимогам щодо вмісту залишкових кількостей пестицидів. При цьому враховують індивідуальні особливості рослини, в якому лікарському засобі вона буде використовуватися і, за наявності, вичерпні відомості щодо обробки даної серії рослинної сировини.

**Мікробіологічна чистота.** Рекомендації з мікробіологічної чистоти лікарських рослинних засобів, що складаються тільки з одного чи декількох видів лікарської рослинної сировини, наведені в статті «Мікробіологічна чистота лікарських засобів і субстанцій для фармацевтичного застосування» (5.1.4).

## Лікарська рослинна сировина

▼ **Важкі метали (2.4.27).** Якщо немає інших зазначень в окремій статті або обґрунтувань, дозволів:

- кадмій: не більше 1.0 ppm;
- свинець: не більше 5.0 ppm;
- ртуть: не більше 0.1 ppm.

Якщо необхідно, можуть бути наведені межі для інших важких металів. ▲

Якщо необхідно, лікарська рослинна сировина має витримувати інші випробування, приклади яких наведені нижче.

Загальна зола (2.4.16).

Зола, не розчинна в кислоті хлористоводневої (2.8.1).

Екстрактивні речовини.

Показник набухання (2.8.4).

Показник гіркоти (2.8.15).

■

**Афлатоксини В<sub>1</sub> (2.8.18).** Якщо необхідно, може вимагатися регламентація вмісту афлатоксинів.

▼ **Охратоксин А (2.8.22).** Якщо необхідно, може вимагатися регламентація вмісту охратоксину А. ▲

**Радіоактивне забруднення.** У деяких специфічних випадках має бути врахований ризик радіоактивного забруднення.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо немає інших зазначень і дозволів, проводять кількісне визначення лікарської рослинної сировини підходящим методом.

## ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

N

▼ **Випробування на афлатоксин В<sub>1</sub> (2.8.18) та охратоксин А (2.8.22)** проводять за вимогою виробника конкретних лікарських рослинних засобів. ▲

**МОНОГРАФІЇ НА ВАКЦИНИ  
ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ  
ЛЮДИНОЮ**





## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЕПАТИТУ А (ІНАКТИВОВАНА, АДСОРБОВАНА)

Vaccinum hepatitis A inactivatum  
adsorbatum

*HEPATITIS A VACCINE (INACTIVATED, ADSORBED)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована, адсорбована) — суспензія, що складається із відповідних штамів вірусу гепатиту А, вирощена в культурі клітин, інактивована валідованим методом і адсорбована на мінеральному носії.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Виробництво вакцин засноване на системі посівних серій вірусу та системі банку клітин. Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю, безпекою й стабільністю.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж вірус, який використовувався для приготування вакцини, що в клінічних випробуваннях продемонструвала задовільні результати з безпеки та ефективності.

*Стандартний препарат.* Як стандартний препарат використовують частину репрезентативної партії, для якої як мінімум підтверджена аналогічна з партією, використаною в клінічних випробуваннях, імуногенність на молодих, здорових, зрілих тваринах, яка викликає не менше 95 % сероконверсію, що вважається відповідним рівню нейтралізуючих антитіл після повного курсу первинної імунізації. За захисний рівень антитіл вважають 20 мМО/мл, визначений методом імуоферментного аналізу.

#### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСУ

Вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах (5.2.3) або в безперервних клітинних лініях, дозволених компетентним уповноваженим органом.

### ПОСІВНІ СЕРІЇ

Штам вірусу гепатиту А, використовуваний для приготування головної посівної серії, слід ідентифікувати архівними записами, що містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** Вірус гепатиту А, що міститься в кожній головній і робочій посівних серіях, ідентифікують із використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Для контролю відтворюваності виробництва визначають концентрацію вірусу у кожній головній і робочій посівних серіях.

**Сторонні агенти.** Робоча посівна серія має витримувати вимоги до посівних серій вірусних вакцин (2.6.16). Крім того, якщо для виділення штаму були використані первинні клітини мавп, слід вжити заходів із забезпечення чистоти штамів від вірусів мавп, таких як вірус імунодефіциту та філовіруси.

#### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР ВІРУСУ

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять в асептичних умовах на ділянці, де не обробляються інші клітини. Середовище для культивування клітин може містити підходящі сироватки тварин (але не сироватку людини). Сироватка та трипсин, використовувані для приготування клітинної суспензії та середовища для культивування, мають бути вільні від сторонніх агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підходящі антибіотики в найменшій ефективній концентрації. Не менше 500 мл культури клітин для виробництва вакцин відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини). Декілька зборів із однієї виробничої культури клітин можуть об'єднуватися і вважатися як одиничний збір.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування вакцин. Якщо у ряді одиничних зборів установлене співвідношення концентрації вірусу до вмісту антигена, що підтверджує відтворюваність виробництва, це випробування надалі можна не проводити в рутинних дослідженнях.

**Ідентифікація.** Випробування на вміст антигена також служить для ідентифікації одиничного збору.

**Відсутність бактерій та грибів.** Одиничний збір має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Мікоплазми (2.6.7).** Одиничний збір має витримувати випробування на мікоплазми з використанням 1 мл для кожного середовища.

## Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована, адсорбована)

**Контрольні клітини.** Контрольні клітини для виробництва культури клітин мають витримувати випробування з ідентифікації та вимоги щодо сторонніх агентів (2.6.16).

**Вміст антигена.** Для контролю відтворюваності виробництва підходящим імунохімічним методом (2.7.1) визначають вміст антигена гепатиту А: вміст має бути в межах, установлених для конкретного продукту.

**Співвідношення концентрації вірусу та вмісту антигена.** Відтворюваність співвідношення концентрації інфекційного вірусу, визначеного підходящим методом на культурі клітин, і вмісту антигена встановлюють валідацією на відповідній кількості одиничних зборів.

### ОЧИЩЕННЯ І ОЧИШЕНИЙ ЗБІР

**Збір,** який може складатися з декількох об'єднаних одиничних зборів, очищають валідованими методами. Якщо у виробництві використовують безперервні клітинні лінії, слід підтвердити, що процес очищення постійно знижує вміст ДНК клітин-хазяїнів.

Тільки очищений збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування інактивованого збору.

**Концентрація вірусу.** В очищеному зборі підходящим методом на культурі клітин визначають концентрацію інфекційного вірусу для контролю відтворюваності виробництва і як відправну точку контролю кривої інактивації.

**Співвідношення антиген : загальний білок.** Підходящим імунохімічним методом (2.7.1) визначають вміст антигена вірусу гепатиту А. Валідованим методом визначають загальний білок. Співвідношення вмісту антигена вірусу гепатиту А до загального білка має бути в межах, установлених для конкретного продукту.

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше 50 нг в еквіваленті на одну дозу для людини, визначений підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Де застосовно, виходячи з виробничих процесів, для підтвердження ефективності очищення можуть бути використані інші підхожі білкові маркери.

**Залишкова ДНК клітин-хазяїнів.** Якщо для розмноження вірусу використовують безперервну клітинну лінію, підходящим методом визначають вміст залишкової ДНК клітин-хазяїнів, що має бути не більше 100 пг в еквіваленті на одну дозу для людини.

**Залишкові реактиви.** Якщо в процесі очищення використовують хімічні реактиви, в очищеному зборі (або інактивованому зборі) слід тестувати їх наяв-

ність, доки валідаційними дослідженнями не підтверджена їх відсутність. Їх концентрація не має перевищувати межі, встановлені для конкретного продукту.

### ІНАКТИВАЦІЯ Й ІНАКТИВОВАНИЙ ЗБІР

Декілька очищених моновалентних зборів одного типу можуть бути об'єднані перед інактивацією. Щоб уникнути втручання у процес інактивації внаслідок агрегації вірусів, слід вжити заходів із запобігання утворення вірусних агрегатів, або вони мають негайно видалятися до і/або у процесі інактивації. Суспензію вірусу інактивують валідованим методом, який дозволяє інактивувати вірус гепатиту А без руйнування антигенної та імуногенної активності: для кожної процедури інактивації будують криву інактивації з концентрації залишкових живих вірусів у не менше трьох тимчасових точках (наприклад, за днями процесу інактивації: 0, 1 і 2). Якщо для інактивації використовують формальдегід, у кінці процесу інактивації перевіряють наявність надмірного вільного формальдегіду.

Тільки інактивований збір, що витримує вимоги, наведені нижче, може використовуватися в приготуванні кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Інактивація.** Проводять тест ампліфікації на залишковий інфекційний вірус гепатиту А, інокульчи в культури клітин аналогічних використаним у процесі виробництва вакцини таку кількість інактивованого збору, яка еквівалентна 5 % партії, або, якщо збір містить еквівалентне 30 000 дозам або більше, але не менше 1500 доз вакцини. Загальний час інкубації має бути не менше 70 діб, і проводять не менше одного пасажу клітин за цей період. У кінці періоду інкубації проводять випробування з підходящою чутливістю на залишковий інфекційний вірус. Після процесу інактивації у пробі не мають виявлятися докази розмноження вірусу гепатиту А. Паралельно як позитивний контроль для підтвердження клітинної чутливості і відсутності взаємодій використовують інокулят інфекційного вірусу.

**Стерильність (2.6.1).** Інактивований вірусний збір має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 2 МО в еквіваленті на одну дозу для людини.

**Вміст антигена.** Визначають вміст антигена вірусу гепатиту А підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Залишкові реактиви.** Як зазначено в розділі «Очищення і очищений збір».

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють із одного або більше інактивованих зборів. Можуть

бути додані підходящі ад'юванти, стабілізатори та антимікробні консерванти.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на вільний формальдегід, антимікробні консерванти і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини на мишах або інших тваринах проведене кількісне визначення і одержані задовільні результати, випробування можна пропустити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Слід підтвердити, що вакцина містить антиген вірусу гепатиту А, підходящим імунохімічним методом (2.7.1), використовуючи специфічні антитіла, або кількісним визначенням *in vivo* (2.7.14).

### ВИПРОБУВАННЯ

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Витримує випробування на стерильність.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина має витримувати випробування на кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту А (2.7.14).

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають біологічне походження клітин, використаних для приготування вакцини.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЕПАТИТУ В (рДНК)

### Vaccinum hepatitis B (ADNr)

#### HEPATITIS B VACCINE (rDNA)

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики гепатиту В (рДНК) – препарат поверхневого антигена гепатиту В (HBsAg), білкового компоненту вірусу гепатиту В; антиген може бути адсорбований на мінеральному носії, такому як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат. Антиген одержують за допомогою технології рекомбінантної ДНК.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Слід підтвердити, що вакцина індукує специфічні захисні антитіла у людини. Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

Вакцину для профілактики гепатиту В (рДНК) одержують експресією вірусного гена, кодуючого HBsAg в дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*) або клітини ссавців (клітини яєчників китайських хом'яків (СНО) або інші підходящі клітинні лінії), очищенням одержаних HBsAg і включенням цих антигенів у імуногенні препарати. Придатність і безпеку клітин встановлює компетентний уповноважений орган.

Вакцина може містити продукт гена S (основний білок), комбінацію продуктів генів S і пре-S2 (серед-

## Вакцина для профілактики гепатиту В (рДНК)

ній білок) або комбінацію продуктів генів S, пре-S2 і пре-S1 (крупний білок).

**Стандартний препарат.** Як стандартний препарат використовують частину репрезентативної партії, для якої як мінімум підтверджена аналогічна з партією, використаною в клінічних випробуваннях, імуногенність на молодих, здорових, зрілих тваринах, яка викликає не менше 95 % сероконверсію, що вважається відповідним рівню HBsAg нейтралізуючих антитіл після повного курсу первинної імунізації. За захисний рівень антитіл вважається не менше 10 мМО/мл.

### ХАРАКТЕРИСТИКА СУБСТАНЦІЇ

У процесі досліджень з розробки слід провести опис антигена. Встановлюють повну білкову, ліпідну та вуглеводну структури антигена. Електронною мікроскопією встановлюють морфологічні характеристики антигенних частинок. Середнє значення плавучої густини антигенних частинок визначають фізико-хімічними методами, такими як центрифугування у градієнті. Описують епітопи антигена. Характеризують первинну структуру білкової фракції антигена (наприклад, визначенням амінокислотного складу, частковим аналізом амінокислотної послідовності і пептидним картуванням).

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Ідентичність, мікробіологічну чистоту, збереження плазміді і постійність виходу визначають на відповідних стадіях виробництва. При використанні клітин ссавців проводять випробування на сторонні агенти та мікоплазми відповідно до вимог статті «Випробування на сторонні агенти у вірусних вакцинах для застосування людиною» (2.6.16), але у випробуванні в культурі клітин на інші сторонні агенти використовують 200 мл збору.

### ОЧИЩЕНИЙ АНТИГЕН

Тільки очищений антиген, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Загальний білок.** Вміст загального білка визначають валідованим методом. Вміст має бути в межах, установлених для конкретного продукту.

**Вміст антигена та ідентифікація.** Кількість і специфічність HBsAg визначають шляхом порівняння з Міжнародним стандартом на HBsAg підтип *ad* або зі стандартом підприємства, використовуючи підходящий імунохімічний метод (2.7.1), такий як радіоімунаналіз (RIA, RIA), імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA), імуноблотинг (бажано з використанням моноклональних антитіл проти захисного епітопу) або одинична радіальна дифузія. Співвідношення антиген/білок має бути в межах, установлених для конкретного продукту.

Молекулярна маса білка основної смужки, визначена за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з натрію додецилсульфатом (ДСН-ПАГ) у відновлюючих умовах, має відповідати очікуваному значенню, виходячи з послідовності нуклеїнових кислот і поліпептидів і можливого глікозилювання.

**Антигенна чистота.** Чистоту антигена визначають, порівнюючи зі стандартним препаратом, використовуючи рідинну хроматографію або інший підходящий метод, такий як ДСН-ПАГ електрофорез із подальшим забарвленням кислотним синім 92 і сріблом. За підходящий чутливий метод вважається метод, який дозволяє визначати домішки при концентрації 1 % від загального білка. Не менше 95 % загального білка має складати поверхневий антиген гепатиту В.

**Склад.** Визначають вміст білків, ліпідів, нуклеїнових кислот і вуглеводів.

**Залишкова ДНК клітини-хазяїна та вектора.** Якщо для виробництва використовувалися клітини ссавців, вміст ДНК має бути менше 10 пг у кількості очищеного антигена, еквівалентній одній дозі для людини.

**Цезій.** Якщо в процесі виробництва використовують солі цезію, проводять випробування на залишкові кількості цезію в очищеному антигені. Вміст має бути в межах, установлених для конкретного продукту.

**Стерильність (2.6.1).** Очищений антиген має витримувати вимоги на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

Залежно від застосованого способу виробництва, можуть знадобитися додаткові випробування очищеного антигена, наприклад випробування на залишкові кількості сироватки тварин, якщо використовують клітини ссавців, або на залишкові хімічні реактиви, використовувані при екстракції та очищенні.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Можуть бути додані підходящі ад'юванти та антимікробні консерванти.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від устанавленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована)****КІНЦЕВА СЕРІЯ**

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на вільний формальдегід, антимікробні консерванти та одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведено кількісне визначення *in vivo* і одержані задовільні результати, то випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

Для ідентифікації вакцини можна використовувати кількісне визначення або, де застосовно, електрофоретичний профіль.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Має витримувати випробування на стерильність.

**Пірогени (2.6.8).** Має витримувати випробування на пірогени. Кожному кроликові вводять дозу, еквівалентну одній дозі для людини.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Вакцина має витримувати випробування на кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) (2.7.15).

**МАРКУВАННЯ**

На етикетці зазначають:

- кількість HBsAg на контейнер;
- тип клітин, використаних для виробництва вакцини;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

**ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ  
ГЕПАТИТУ А (ІНАКТИВОВАНА)  
ТА ГЕПАТИТУ В (рДНК)  
(АДСОРБОВАНА)**

**Vaccinum hepatitis A inactivatum et  
hepatitidis B (ADNr) adsorbatum**

**HEPATITIS A (INACTIVATED) AND HEPATITIS B  
(rDNA) VACCINE (ADSORBED)**

**ВИЗНАЧЕННЯ**

Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована) – суспензія, що складається із відповідного штаму вірусу гепатиту А, вирощена в культурі клітин, інактивована валідованим методом, і поверхневого антигена гепатиту В (HBsAg), білкового компонента вірусу гепатиту В, одержаного за допомогою технології рекомбінантної ДНК; антигени адсорбують на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**ВИРОБНИЦТВО****ЗАГАЛЬН ПОЛОЖЕННЯ**

Два компоненти вакцини готують, як зазначено в статтях «Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована, адсорбована)», «Вакцина для профілактики гепатиту В (рДНК) (адсорбована)», і вони мають витримувати вимоги, наведені у цих статтях.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

**Стандартний препарат.** Як стандартний препарат використовують частину репрезентативної партії, для якої як мінімум підтверджена аналогічна з партією, використаною в клінічних випробуваннях, імуногенність на молодих, здорових, статевозрілих тваринах, яка викликає не менше 95 % сероконверсію, що вважається відповідним рівню нейтралізуючих антитіл після повного курсу первинної імунізації. Для гепатиту А захисним рівнем антитіл вважається не менше 20 мМО/мл, визначений методом імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA). Для гепатиту В захисним рівнем антитіл проти HBsAg вважається не менше 10 мМО/мл.

## Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину готують із одного або більше інактивованих зборів вірусу гепатиту А й одного або більше серій очищеного антигена.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини, де застосовно, проведені випробування на вільний формальдегід, антимікробні консерванти та одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведено кількісне визначення *in vivo* на компоненти гепатиту А і гепатиту В і одержані задовільні результати, то випробування можна пропустити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Слід підтвердити, що вакцина містить антиген вірусу гепатиту А і поверхневий антиген гепатиту В, підходящим імунохімічним методом (2.7.1), використовуючи специфічні антитіла, або випробуванням імуногенності на мишах, наведеним в розділі «Кількісне визначення».

### ВИПРОБУВАННЯ

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективною кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 2 МО на одну дозу для людини.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Компонент гепатиту А.** Вакцина має витримувати випробування на кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту А (2.7.14).

**Компонент гепатиту В.** Вакцина має витримувати випробування на кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) (2.7.15).

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- кількість антигена вірусу гепатиту А і поверхнього антигена гепатиту В на контейнер;
- тип клітин, використаних для виробництва вакцини;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ (АДСОРБОВАНА)

### Vaccinum diphtheriae adsorbatum

#### DIPHTHERIA VACCINE (ADSORBED)

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована) — препарат дифтерійного анатоксину, обробленого формальдегідом і адсорбованого на мінеральному носії. Анатоксин готують із токсину, отриманого при вирощуванні *Corynebacterium diphtheriae*, подальшою обробкою формальдегідом.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**Специфічна токсичність.** Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному з 5 здорових мурчаків масою 250-350 г,

що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 42 діб після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми дифтерії або гине від дифтерії. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз; вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

### НЕРОЗФАСОВАНИЙ ОЧИЩЕНИЙ АНАТОКСИН

Для виробництва дифтерійного токсину, з якого отримують анатоксин, використовують посівні культури, засновані на певних системах посівних серій, зберігаючи здатність культури утворювати токсин, і, якщо необхідно, проводять обережну повторну селекцію для відновлення токсигенності. Високо токсигенний штам *Corynebacterium diphtheriae* з відомими походженням й історією вирощують у підходящому рідкому середовищі. У кінці культивування визначають чистоту кожної культури та видаляють забруднені культури. В асептичних умовах якомога частіше від бактеріальної маси відокремлюють середовище для культивування, що містить токсин. Визначають вміст токсину (Lf на мілілітр) (2.7.27) для контролю відтворюваності виробництва. Одиничні збори можуть об'єднуватися для приготування нерозфасованого очищеного анатоксину. Токсин очищають для видалення речовин, здатних викликати небажані поствакцинальні реакції у людини. Очищений токсин знешкоджують формальдегідом, використовуючи метод, що дозволяє уникнути руйнування імуногенної активності анатоксину і реверсії анатоксину в токсин, особливо при нагріванні. Як альтернатива очищення анатоксину може проводитися після знешкодження формальдегідом.

Тільки нерозфасований очищений анатоксин, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять визначення на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Відсутність токсину та реверсії анатоксину.** Використовуючи той самий буферний розчин (без адсорбенту), який входить до складу кінцевої вакцини, готують розчин нерозфасованого очищеного анатоксину в концентрації 100 Lf/мл. Отриманий розчин ділять на дві рівні частини. Одну частину витримують при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , іншу — при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом 6 тижнів. На культурі клітин Vero проводять випробування на присутність активного дифтерійного токсину, використовуючи по 50 мкл/лунку обох зразків. Зразок не має містити антимікробні консерванти, і концентрація знешкоджуючих ре-

човин має бути нижчою за концентрацію, яка токсична для клітин Vero. Неспецифічну токсичність можна усунути діалізом.

Використовують свіжотрипсинізовані клітини Vero у підходящій концентрації, наприклад  $2.5 \times 10^5$  мл<sup>-1</sup>, і стандартний дифтерійний токсин, розведений у 100 Lf/мл дифтерійного анатоксину. Підходящий стандартний дифтерійний токсин має містити або не менше 100 LD<sub>50</sub>/мл, або від 67 до 133 Іг/100 в 1 Lf і від 25 000 до 50 000 мінімальних реактивних доз у шкірній реакції мурчаків у 1 Lf (підходящим стандартним токсином може бути БСП дифтерійного токсину). Токсин розводять у 100 Lf/мл дифтерійного анатоксину до відповідної концентрації, наприклад  $2 \times 10^{-4}$  Lf/мл. Готують послідовні двократні розведення розведеного дифтерійного токсину та використовують нерозведену випробовувану пробу (50 мкл/лунку). Розподіляють їх по лунках стерильних планшетів для тканинних культур, що містять середовище, підхоже для клітин Vero. Для встановлення специфічності будь-яких спостережуваних цитотоксичних ефектів на дифтерійний токсин паралельно готують розведення токсину, нейтралізованого протидифтерійною сироваткою відповідної концентрації, наприклад 100 МО/мл. Для перевірки нормального клітинного росту в випробування включають контрольні лунки без анатоксину або токсину з нетоксичним анатоксином у концентрації 100 Lf/мл на кожну лунку. До кожної лунки додають суспензію клітин, закривають планшет і інкубують при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом 5-6 діб. Про наявність цитотоксичного ефекту судять, якщо повністю інгібується метаболізм клітин Vero, про що свідчить рН індикатор середовища. Цитотоксичний ефект підтверджують мікроскопічним дослідженням або підходящим забарвленням, таким як МТТ-барвник. Результати випробування вважаються невірогідними, якщо  $5 \times 10^{-5}$  Lf/мл стандартного дифтерійного токсину в 100 Lf/мл анатоксину не виявляють цитотоксичного ефекту на клітини Vero або якщо цитотоксичний ефект цієї кількості токсину не нейтралізований у лунках, що містять протидифтерійну сироватку. Нерозфасований очищений анатоксин витримує випробування, якщо в жодній пробі не виявлена токсичність, що нейтралізується протидифтерійною сироваткою.

**Антигенна чистота (2.7.27).** Не менше 1500 Lf/мг білкового азоту.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованого очищеного анатоксину на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Можуть бути додані підхожі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають



## Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена)

на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на антимікробні консерванти та кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для нерозфасованого очищеного анатоксину або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищуватиме 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Дифтерійний анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 30 МО на одну дозу для людини.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- де застосовно, що вакцина призначена для первинної вакцинації дітей і не обов'язково придатна для посилення дози або для застосування дорослими;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ (АДСОРБОВАНА, ЗІ ЗМЕНШЕНИМ ВМІСТОМ АНТИГЕНА)

Vaccinum diphtheriae, antigeniis minutum, adsorbatum

*DIPHTHERIA VACCINE (ADSORBED, REDUCED ANTIGEN CONTENT)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена) — препарат дифтерійного анатоксину, обробленого формальдегідом і адсорбованого на мінеральному носії. Анатоксин готують із токсину, отриманого при вирощуванні *Corynebacterium diphtheriae* і подальшою обробкою

формальдегідом. Слід компетентному уповноваженому органу надати дані про те, що використані кількості дифтерійного анатоксину не викликають несприятливої реакції у пацієнтів з вікових груп, для яких призначена вакцина.

## ВИРОБНИЦТВО

### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**Специфічна токсичність.** Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному з 5 здорових мурчаків масою 250-350 г, що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 42 діб після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми дифтерії або гине від дифтерії. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз; вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

### НЕРОЗФАСОВАНИЙ ОЧИЩЕНИЙ АНАТОКСИН

Нерозфасований очищений анатоксин готують, як зазначено в статті «Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)», і він має витримувати вимоги, наведені в цій статті.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованого очищеного анатоксину на мінеральний носій, такий як гідратований алюмінію фосфат або алюмінію гідроксид. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Можуть бути додані підхожі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підхожим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на антимікробні консерванти та кількісне визначення й одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для нерозфасованого очищеного анатоксину або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищуватиме 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Дифтерійний анатоксин ідентифікують підхожим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат. Якщо не отримують задовільний результат з адсорбованої на алюмінію гідроксид вакцини, випробування повторюють таким чином: 15 мл випробовуваної вакцини центрифугують і осад суспендують у 5 мл свіжоприготованої суміші розчину 56 г/л *натрію едетату Р*; розчину 90 г/л *натрію дигідрофосфату Р* (1:49). Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 6 год і центрифугують. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підхожим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективною кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

## Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована)

**Стерильність (2.6.1).** Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 2 МО на одну дозу для людини.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ ТА ПРАВЦЯ (АДСОРБОВАНА)

Vaccinum diphtheriae et tetani,  
adsorbatum

### DIPHTHERIA AND TETANUS VACCINE (ADSORBED)

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована) — препарат дифтерійного анатоксину, обробленого формальдегідом, і правцевого анатоксину, обробленого формальдегідом, адсорбованих на мінеральному носії. Анатоксини готують із токсинів, отриманих при вирощуванні *Corynebacterium diphtheriae* і *Clostridium tetani*, відповідно.

### ВИРОБНИЦТВО

### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Специфічна токсичність дифтерійного та правцевого компонентів. Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному з 5 здорових мурчаків масою 250–350 г, що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути

на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 42 діб після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми або гине від дифтерії або правця. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз; вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

### НЕРОЗФАСОВАНІ ОЧИЩЕНІ ДИФТЕРІЙНИЙ ТА ПРАВЦЕВИЙ АНАТОКСИНИ

Нерозфасовані очищені анатоксини готують, як зазначено в статтях «Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)» і «Вакцина для профілактики правця (адсорбована)», і вони мають витримувати вимоги, наведені в цих статтях.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованих очищених анатоксинів на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Можуть бути додані підходящі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від устаненого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на антимікробні консерванти та кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

## **Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена(-ів))**

Якщо для нерозфасованих очищених анатоксинів або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищує 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

### **ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.** Дифтерійний анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат.

**В.** Правцевий анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. Прозора надосадова рідина, одержана для проведення випробування «Ідентифікації А», має вступати у взаємодію з відповідною протиправцевою сироваткою, утворюючи преципітат.

### **ВИПРОБУВАННЯ**

**Алюміній** (2.5.13). Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід** (2.4.18). Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність** (2.6.1). Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

### **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Дифтерійний компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 30 МО на одну дозу для людини.

**Правцевий компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 40 МО на одну дозу для людини.

### **МАРКУВАННЯ**

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- де застосовно, що вакцина призначена для первинної вакцинації дітей і необов'язково придатна для посилення дози або для застосування дорослими;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## **ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ ТА ПРАВЦЯ (АДСОРБОВАНА, ЗІ ЗМЕНШЕНИМ ВМІСТОМ АНТИГЕНА(-ІВ))**

*Vaccinum diphtheriae et tetani, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum*

*DIPHTHERIA AND TETANUS VACCINE (ADSORBED, REDUCED ANTIGEN(S) CONTENT)*

### **ВИЗНАЧЕННЯ**

Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена(-ів)) — препарат дифтерійного анатоксину, обробленого формальдегідом, і правцевого анатоксину, обробленого формальдегідом, адсорбованих на мінеральному носії. Анатоксини готують із токсинів, отриманих при вирощуванні *Corynebacterium diphtheriae* і *Clostridium tetani*, відповідно. Слід компетентному уповноваженому органу надати дані про те, що використані кількості дифтерійного анатоксину не викликають несприятливої реакції у пацієнтів з вікових груп, для яких призначена вакцина.

### **ВИРОБНИЦТВО**

#### **ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ**

**Специфічна токсичність дифтерійного та правцевого компонентів.** Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному

## **Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована, зі зменшенням вмістом антигена(-ів))**

з 5 здорових мурчаків масою 250-350 г. що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 42 діб після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми або гине від дифтерії або правця. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз: вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

### **НЕРОЗФАСОВАНІ ОЧИЩЕНІ ДИФТЕРІЙНИЙ ТА ПРАВЦЕВИЙ АНАТОКСИНИ**

Нерозфасовані очищені анатоксини готують, як зазначено в статтях «Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)» і «Вакцина для профілактики правця (адсорбована)», і вони мають витримувати вимоги, наведені в цих статтях.

### **КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА**

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованих очищених анатоксинів на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Можуть бути додані підхожі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підхожим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

### **КІНЦЕВА СЕРІЯ**

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випро-

бування на антимікробні консерванти та кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для нерозфасованих очищених анатоксинів або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищуватиме 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

### **ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.** Дифтерійний анатоксин ідентифікують підхожим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат. Якщо не отримують задовільний результат з адсорбованої на алюмінію гідроксид вакцини, випробування повторюють таким чином: 15 мл випробовуваної вакцини центрифугують і осад суспендують у 5 мл свіжоприготованої суміші розчину 56 г/л *натрію едетату Р*: розчину 90 г/л *натрію дигідрофосфату Р* (1:49). Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 6 год і центрифугують. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат.

**В.** Правцевий анатоксин ідентифікують підхожим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. Прозора надосадова рідина, одержана для проведення випробування «Ідентифікації А», має вступати у взаємодію з відповідною протиправцевою сироваткою, утворюючи преципітат.

### **ВИПРОБУВАННЯ**

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підхожим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективною кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

## Вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку (цільноклітинна) (адсорбована)

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Дифтерійний компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 2 МО на одну дозу для людини.

**Правцевий компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 20 МО на одну дозу для людини.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ДИФТЕРІЇ, ПРАВЦЯ ТА КАШЛЮКУ (ЦІЛЬНОКЛІТИННА) (АДСОРБОВАНА)

*Vaccinum diphtheriae, tetani et  
pertussis ex cellulis integris adsorbatum*

*DIPHTHERIA, TETANUS AND PERTUSSIS WHOLE  
CELL VACCINE (ADSORBED)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку (цільноклітинна) (адсорбована) — препарат дифтерійного анатоксину, обробленого формальдегідом, правцевого анатоксину, обробленого формальдегідом, адсорбованих на мінеральному носії, і до якого додана суспензія інактивованого *Bordetella pertussis*. Оброблені формальдегідом анатоксини готують із токсинів, отриманих при вирощуванні *Corynebacterium diphtheriae* і *Clostridium tetani*, відповідно.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Специфічна токсичність дифтерійного та правцевого компонентів. Спосіб виробництва валідують для під-

твердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному з 5 здорових мурчаків масою 250–350 г, що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 42 діб після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми або гине від дифтерії або правця. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз; вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

#### *НЕРОЗФАСОВАНІ ОЧИЩЕНІ АНАТОКСИНИ ДИФТЕРІЇ ТА ПРАВЦЯ, НЕРОЗФАСОВАНА ІНАКТИВОВАНА СУСПЕНЗІЯ В. PERTUSSIS*

Нерозфасовані очищені анатоксини готують, як зазначено в статтях «Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)», «Вакцина для профілактики правця (адсорбована)» і «Вакцина для профілактики кашлюку (цільноклітинна, адсорбована)», і вони мають витримувати вимоги, наведені в цих статтях.

#### *КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА*

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованих очищених анатоксинів на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат, з подальшим змішуванням відповідної кількості суспензії інактивованої *B. pertussis*. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Концентрація бактерій *B. pertussis* у кінцевій нерозфасованій вакцині не має перевищувати 20 МО каламутності в одній дозі для людини. Склад послідовних серій кінцевої нерозфасованої вакцини при використанні 2 або більше штамів *B. pertussis* має бути таким самим, що і співвідношення кожного штаму, виміряне в одиницях каламутності. Можуть бути додані підходящі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведене нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим лімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

## КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на антимікробні консерванти та кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для нерозфасованих очищених анатоксинів або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищуватиме 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Дифтерійний анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протидифтерійною сироваткою, утворюючи преципітат.

**В.** Правцевий анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. Прозора надосадова рідина, одержана для проведення випробування «Ідентифікація А», має вступати у взаємодію з відповідною протиправцевою сироваткою, утворюючи преципітат.

**С.** У випробовуваній вакцині розчиняють достатню кількість *натрію цитрату Р* для одержання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі 37 °С близько 16 год і центрифугують для одержання бактеріального преципітату. Ідентифікують вакцину для профілактики кашлюку аглютинацією бактерій із ресуспендованого преципітату специфічною до *B. pertussis* імуносироваткою або кількісним визначенням.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Специфічна токсичність компонента кашлюку.** Використовують дві групи тварин, не менше 5 здорових мишей у кожній, масою від 14 г до 16 г для введення

вакцини і контролю з використанням фізіологічного розчину. Підбирають мишей однієї статі або самок і самців, рівномірно розподіляючи по групах. Кожній миші піддослідної групи внутрішньочеревно вводять по 0.5 мл вакцини, що містить кількість вакцини еквівалентну половині однієї дози для людини. Кожній миші контрольної групи вводять по 0.5 мл стерильного розчину 9 г/л *натрію хлориду Р*, що переважно містить ту саму кількість антимікробних консервантів, що і випробовувана вакцина. Кожну групу мишей зважують безпосередньо перед випробуванням, через 72 год і 7 діб після ін'єкції. Вакцина витримує випробування, якщо виконуються всі три умови:

- через 72 год після ін'єкції загальна маса вакцинованих мишей не менша маси мишей до ін'єкції;
- через 7 діб після ін'єкції середнє збільшення маси на одну вакциновану мишу складає не менше 60 % від маси контрольної миші;
- не більше 5 % вакцинованих мишей гине в ході випробування.

Випробування можна повторювати і результати випробувань можна об'єднувати.

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.12).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Дифтерійний компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 30 МО на одну дозу для людини.

**Правцевий компонент.** Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8).

Якщо випробування проводять на мурчаках, нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 40 МО на одну дозу для людини; якщо випробування проводять на мишах, нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встанов-

## Вакцина для профілактики інфекцій, викликаних *Haemophilus influenzae* типу b (кон'югована)

леної активності має бути не менше 60 МО на одну дозу для людини.

**Компонент кашлюку.** Кількісне визначення проводять методом визначення вакцини для профілактики кашлюку (цільноклітинної) (2.7.7).

Установлена активність має бути не менше 4 МО на одну дозу для людини, і нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 2 МО на одну дозу для людини.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- де застосовно, що вакцина призначена для первинної вакцинації дітей і не обов'язково придатна для посилення дози або для застосування дорослими;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИПУ B (КОН'ЮГОВАНА)

*Vaccinum haemophili stripi b  
conjugatum*

### *HAEMOPHILUS TYPE B CONJUGATE VACCINE*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики інфекцій, викликаних *Haemophilus influenzae* типу b (кон'югована) — рідкий або ліофілізований препарат полісахариду, отриманий із відповідного штаму *Haemophilus influenzae* типу b, ковалентно пов'язаного з білком-носієм. Полісахарид полірибозилрибітол фосфат (ПРРФ, PRP) — лінійний сополімер, що складається із одиниць 3-β-D-рибофуранозил-(1→1)-рибітол-5-фосфату [(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>P)<sub>n</sub>], з певним розміром молекули. Білок-носії після кон'югації з PRP здатний індукувати Т-клітинозалежну В-клітинну імунну відповідь до полісахариду.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою для людини. Виробництво PRP і білка-носія засноване на системі посівних серій.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

У ході досліджень з розробки і коли необхідна повторна валідація виробничих процесів, випробуваннями на тваринах слід підтвердити стабільну індукцію Т-клітинозалежної В-клітинної імунної відповіді.

Стабільність кінцевої серії і відповідних проміжних препаратів оцінюють, використовуючи одне і більше індикаторні випробування. Такі випробування можуть включати визначення молекулярної маси, визначення вільного PRP у кон'югаті і тест імуногенності на мишах. Виходячи з одержаних результатів випробувань зі стабільності, для цих індикаторних випробувань установлюють вимоги при випуску, що гарантують задовільну якість вакцин у кінці терміну придатності.

#### ПОСІВНІ СЕРІЇ БАКТЕРІЙ

Методами з підхожою чутливістю підтверджують відсутність контамінації у посівних серіях *H. influenzae* типу b. Це може включати інокуляцію в підходжі середовища, вивчення морфології колоній, мікроскопічне дослідження Грам-зabarвлених мазків і аглютинацію культур підхожими специфічними антисироватками.

У середовищах для підтримки життєздатності штамів, ліофілізації або для зберігання в замороженому вигляді не використовують багатокомпонентні препарати тваринного походження.

Вироблений посівною серією PRP рекомендується характеризувати, використовуючи метод спектрометрії ядерного магнітного резонансу (2.2.33).

#### ПОЛІСАХАРИД (PRP) *H. INFLUENZAE* ТИПУ B

*H. influenzae* типу b вирощують у рідкому середовищі, що не містить високомолекулярні полісахариди; якщо який-небудь інгредієнт середовища містить речовини груп крові, процес валідують для підтвердження їх видалення після очищення. Бактеріальну чистоту культур перевіряють методами, що мають відповідну чутливість, а саме: інокуляцією в підходжі середовища, дослідженням морфології колоній і мазків Грам-зabarвлених, аглютинацією культур підхожими специфічними антисироватками. Куль-



тура може бути інактивована. PRP виділяють із середовища для культивування і очищають підходящими методами. Леткі речовини, в тому числі воду, в очищених полісахаридах визначають підходящими методами; одержаний результат використовують для розрахунку результатів певних випробувань у перерахунок на суху речовину, як зазначено нижче.

Тільки PRP, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кон'югата.

**Ідентифікація.** PRP ідентифікують імунохімічним методом (2.7.1) або іншими підходящими методами, наприклад спектрометрією  $^1\text{H}$ -ядерного магнітного резонансу (2.2.33).

**Молекулярно-масовий розподіл.** Відсотковий вміст PRP до заданого рівня  $K_0$  і в межах рівня  $K_0$  визначають ексклюзивною хроматографією (2.2.30); прийнятний рівень встановлюють для конкретного продукту, і кожна партія PRP має витримувати вимоги з даної межі. Як інформація в Табл. 1219.-1 наведені межі для в наш час дозволених до застосування продуктів, з використанням зазначених стаціонарних фаз. Де застосовно, також визначають молекулярно-масовий розподіл після хімічної модифікації полісахариду.

Для визначення молекулярно-масового розподілу також може бути використаний метод рідинної хроматографії (2.2.29) з мультикутовим лазерним світлорозсіюючим детектором.

Замість визначення молекулярно-масового розподілу можна використовувати валідоване визначення ступеня полімеризації або середню (за масою) відносну молекулярну масу та дисперсії молекулярних мас.

**Рибоза (2.5.31).** Вміст має бути в межах, установлених компетентним уповноваженим органом для конкретного продукту, в перерахунок на суху речовину.

**Фосфор (2.5.18).** Вміст має бути в межах, установлених компетентним уповноваженим органом для конкретного продукту, в перерахунок на суху речовину.

**Білки (2.5.16).** Не більше 1.0 %, у перерахунок на суху речовину. Використовують достатню кількість PRP, що дозволяє визначення білка в концентрації 1 % або більше.

**Нуклеїнові кислоти (2.5.17).** Не більше 1.0 %, у перерахунок на суху речовину.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 25 МО на мікрограм PRP.

**Залишкові реактиви.** Де застосовно, проводять випробування з визначення залишкових реактивів, використаних при інактивації й очищенні. Для кожного

конкретного продукту встановлюють прийнятний рівень кожного реактиву, і кожна партія PRP має витримувати встановлені вимоги. Якщо валідаційними дослідженнями підтверджено видалення залишкових кількостей реактивів, випробування для PRP можуть бути пропущені.

## **БЛОК-НОСІЙ**

Блок-носії вибирають так, щоб після кон'югації з PRP він був здатний індукувати Т-клітинозалежну В-клітинну імунну відповідь. Як інформація в Табл. 1219-1 наведені білки-носії і методи скріплення препаратів, дозволених до застосування в наш час. Білки-носії виробляють відповідними культурами мікроорганізмів; перевіряють бактеріальну чистоту культур; культура може бути інактивована; білок-носії очищають підходящими методами.

Тільки білок-носії, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кон'югата.

**Ідентифікація.** Білок-носії ідентифікують підходящими імунохімічними методами (2.7.1).

**Стерильність (2.6.1).** Випробування проводять, використовуючи по 10 мл для кожного середовища або еквівалент 100 дозам, що менше.

**Дифтерійний анатоксин.** Дифтерійний анатоксин виробляють, як зазначено в статті «Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована)», і він має витримувати наведені вимоги до нерозфасованого очищеного анатоксину.

**Правцевий анатоксин.** Правцевий анатоксин виробляють, як зазначено в статті «Вакцина для профілактики правця (адсорбована)», і він має витримувати наведені вимоги до нерозфасованого очищеного анатоксину, окрім антигенної чистоти, яка має бути не менше 1500 Lf на міліграм білкового азоту.

**Дифтерійний білок CRM 197.** Не менше 90 %, визначений підходящим методом. Підходжі тести проводяться для валідації або рутинного підтвердження нетоксичності продукту.

**ОМР (комплекс білка зовнішньої мембрани менінгококів групи В).** ОМР має витримувати вимоги на ліпополісахариди та пірогени.

**Ліпополісахарид.** Не більше 8 %, визначений підходящим методом.

**Пірогени (2.6.8).** Кожному кролику на кілограм маси тіла вводять по 0.25 мкг ОМР.

## **НЕРОЗФАСОВАНИЙ КОН'ЮГАТ**

Для проведення кон'югації PRP хімічно модифікують: звичайно PRP частково деполімеризують або

## Вакцина для профілактики інфекцій, викликаних *haemophilus influenzae* типу b (кон'югована)

до, або в процесі цих процедур. Перед кон'югацією в білок-носії або PRP можуть бути введені реактивні функціональні групи або спейсери. Як міру відтворюваності контролюють ступінь дериватизації. Кон'югат одержують ковалентним зв'язуванням PRP з білком-носієм. Де застосовно, функціональні групи, що не прореагували, але потенційно здатні реагувати, перетворюють на нездатні реагувати за допомогою кепінг-агентів. Кон'югат очищають, видаляючи реактиви.

Тільки нерозфасований кон'югат, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини. Для кожного випробування і для кожного конкретного продукту встановлюють межі критерію прийнятності, та кожна партія кон'югату має витримувати вимоги з цих меж. Як інформація у Табл. 1219.-2 наведені межі в деяких випробуваннях для препаратів, дозволених до застосування в наш час. Для ліофілізованих вакцин, якщо процес ліофілізації може вплинути на випробовуваний компонент, деякі випробування краще проводити на кінцевій серії, ніж на нерозфасованому кон'югаті.

**PRP.** Вміст PRP визначають кількісним визначенням фосфору (2.5.18) або кількісним визначенням рибози (2.5.31), або імунохімічним методом (2.7.1).

**Білки.** Вміст білка визначають підходящим хімічним методом (наприклад, 2.5.16).

**Співвідношення PRP до білка.** Розраховують співвідношення.

**Молекулярно-масовий розподіл.** Молекулярно-масовий розподіл визначають ексклюзивною хроматографією (2.2.30).

**Вільний PRP.** Використовують безліч методів для розділення PRP від кон'югата, включаючи преципітацію, гель-фільтрацію, ексклюзивну, аніонообмінну і гідрофобну хроматографії, ультрафільтрацію і ультрацентрифугування. Далі кількість вільного PRP можна визначати декількома методами, зокрема високоефективною аніонообмінною хроматографією з пульсуючим амперметричним детектором (HPLC-PAD) і імуноаналізом із анти-PRP антитілами.

**Вільний білок-носії.** Вміст вільного білка-носія визначають підходящим методом або безпосередньо, або перерахунком результатів інших випробувань. Вміст має бути у встановлених для конкретного продукту межах.

**Функціональні групи, що не прореагували.** У нерозфасованому кон'югаті не мають виявлятися функціональні групи, що не прореагували; в разі їх виявлення на цій стадії валідаційними дослідженнями слід довести, що вони видаляються в ході подальших технологічних процесів (наприклад, через короткий період напіврозпаду).

Таблиця 1219.-1

Характеристики препарату, специфікації PRP і білка-носія в наш час дозволених до застосування в препаратах

Носій			Полісахарид <i>H. influenzae</i> типу b		Кон'югація	
Тип	Чистота	Номинальна кількість на дозу	Тип PRP	Номинальна кількість на дозу	Метод скріплення	Процедура
Дифтерійний анатоксин	> 1500 Lf на міліграм азоту	18 мкг	зменшений у розмірах PRP $K_p$ : 0.6-0.7, з використанням агарози поперечно-зшитої для хроматографії P	25 мкг	ціанбромідна активація PRP	активованій дифтерійний анатоксин (D-AH*), ціанбромід активований PRP
Правцевий анатоксин	> 1500 Lf на міліграм азоту	20 мкг	PRP $\geq 50\%$ $\leq K_p$ 0.30, з використанням агарози поперечно-зшитої для хроматографії P	10 мкг	карбодімід опосередкований	ADH-активованій PRP (PRP-cov.-AH) + правцевий анатоксин + EDAC
CRM 197 дифтерійний білок	> 90 % дифтерійного білка	25 мкг	зменшений у розмірах PRP $D_p = 15-35$ або $10-35$	10 мкг	відновне амінування (1-кроковий метод) або N-гідроксисуццинімідна активація	пряме зв'язування PRP з CRM 197 (ціанбромідрид активований)
Білок зовнішньої мембрани менингококів групи B (OMP)	везикули білка зовнішньої мембрани: $\leq 8\%$ ліпополісахариду	125 мкг або 250 мкг	зменшений у розмірах PRP $K_p < 0.6$ , з використанням агарози поперечно-зшитої для хроматографії P або $M_{ср} > 50 \times 10^3$	7.5 мкг або 15 мкг	тіоефірний зв'язок	активація PRP CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + тіоактивованій OMP

ADH — адипінової кислоти дигідрозид  
 BrAc — бромацетил хлорид  
 BuA2 — бутан-1.4-діамід  
 CDI — карбоніл діімідазол  
 Dp — ступінь полімеризації  
 EDAC — 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодімід  
 IM — імідазол  
 $M_{ср}$  — середня (за масою) відносна молекулярна маса

**Важлива для профілактики інфекцій, викликаних *haemophilus influenzae* типу b (кон'югована)**

**Залишкові реактиви.** Видалення залишкових реактивів, таких як ціаніди, EDAC (етилдиметиламінопропілкарбодіімід) і фенол, підтверджують підходящими випробуваннями або валідацією процесу.

**Стерильність (2.6.1).** Випробування проводять, використовуючи по 10 мл для кожного середовища або еквівалент 100 дозам, що менше.

**КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА**

До нерозфасованого кон'югата перед розведенням до кінцевої концентрації підходящим розчинником можуть бути додані ад'ювант, антимікробні консерванти та стабілізатор.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, підходящими хімічними або фізико-хімічними методами визначають кількість антимікробних консервантів. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від встановленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Має витримувати випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**КІНЦЕВА СЕРІЯ**

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведене випробування на антимікробні консерванти і одержані задовільні результати, це випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**pH (2.2.3).** Значення pH, якщо необхідно розчиненої вакцини має бути в межах, встановлених для конкретного продукту.

**Вільний PRP.** Використовують безліч методів для розділення PRP від кон'югата, включаючи преципіта-

цію, гель-фільтрацію, ексклюзивну, аніонообмінну і гідрофобну хроматографію, ультрафільтрацію і ультрацентрифугування. Далі кількість вільного PRP можна визначати низкою методів, зокрема НРАЕС-PAD і імуноаналізом з анти-PRP антитілами. Кількість вільного PRP має бути не більше встановленої для конкретного продукту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

Вакцину ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1) для PRP.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**PRP.** Не менше 80 % від кількості PRP, зазначеної на етикетці. PRP визначають або кількісним визначенням рибози (2.5.31), або кількісним визначенням фосфору (2.5.18), або імунохімічним методом (2.7.1), або аніонообмінною рідинною хроматографією із пульсуючим амперметричним детектором (2.2.29).

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Вода (2.5.12).** Не більше 3.0 % для ліофілізованої вакцини.

**Стерильність (2.6.1).** Витримує випробування на стерильність.

**Пірогени (2.6.8).** Витримує випробування на пірогени. Кожному кролику на кілограм маси тіла вводять таку кількість вакцини, яка еквівалентна: 1 мкг PRP для вакцини з дифтерійним анатоксином або CRM 197 дифтерійним білком як носієм; 0.1 мкг PRP для вакцини з правцевим анатоксином як носієм; 0.025 мкг PRP для вакцини з ОМР як носієм.

Таблиця 1219.-2

Вимоги до нерозфасованого кон'югата в наш час дозволених до застосування препаратах

Випробування	Білок-носії			
	Дифтерійний анатоксин	Правцевий анатоксин	CRM 197	ОМР
Вільний PRP	< 37 %	< 20 %	< 25 %	< 15 %
Вільний білок	< 4 %	< 1 %, де застосовно	< 1 % або < 2 % залежно від методу скріплення	не застосовно
Співвідношення PRP до білка	1.25-1.8	0.30-0.55	0.3-0.7	0.05-0.1
Молекулярна маса ( $K_D$ ): агароза поперечно-зшита для хроматографії P	95 % < 0.75	60 % < 0.2	50 % 0.3-0.6	85 % < 0.3
агароза поперечно-зшита для хроматографії P1	0.6 - 0.7	85 % < 0.5		

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- кількість мікрограмів PRP на одну дозу для людини;
- тип і номінальний вміст білка-носія на одну дозу для людини.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КАШЛЮКУ (ЦІЛЬНОКЛІТИННА, АДСОРБОВАНА)

*Vaccinum pertussis ex cellulis integris  
adsorbatum*

*PERTUSSIS VACCINE (WHOLE CELL, ADSORBED)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики кашлюку (цільноклітинна, адсорбована) — стерильна суспензія інактивованих цілих клітин одного або декількох штамів *Bordetella pertussis*, оброблена для мінімізації токсичності, зі збереженням активності. Вакцина містить мінеральний адсорбент, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини, зіставної із вакциною з підтвердженою клінічною ефективністю та безпекою для людини.

Рівні токсину кашлюку, активних термолабільних токсинів (дермонекротичний токсин) або трахеального цитотоксину мають бути зіставні з рівнями у вакцині з підтвердженою клінічною ефективністю та безпекою для людини і затверджені компетентним уповноваженим органом.

#### ВИБІР ШТАМУ ВАКЦИНИ

Вакцина складається із суміші одного або більше штамів *B. pertussis*. Штами *B. pertussis*, використані для приготування вакцини, мають добре характеризуватися і бути вибрані таким чином, щоб у кінцевій вакцині містилися переважно клітини фази 1, що являють собою фімбрії 2 і 3, визначені методом аглютинації або іншим підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

## ПОСІВНІ СЕРІЇ

Виробництво засноване на системі посівних серій.

Використаний штам *B. pertussis* слід ідентифікувати архівними записами, що містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним, характеристики виділення й особливо всіх періодичних випробувань для перевірки природи штаму.

Використані середовища для вирощування *B. pertussis* ретельно відбираються і вони мають дозволяти мікроорганізму зберігати характеристики фази 1.

Якщо використовують кров або продукти крові тварин, їх видаляють, промиваючи збір бактерій.

У жодному середовищі для розмноження бактерій, посіву або для вакцини не використовують кров або продукти крові людини.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Кожен штам вирощують окремо з робочої посівної серії.

Культури перевіряють на різних стадіях ферментації (субкультури та основної культури) на чистоту, ідентичність, клітинну каламутність і рН. Слід видаляти культури незадовільної якості.

Слід підтвердити, що виробничі культури стабільні щодо швидкості росту, рН і виходу клітин або клітинних продуктів.

Бактерії збирають, промивають для видалення залишків речовин середовища для культивування і суспендують у розчині 9 г/л натрію хлориду Р або в іншому підходящому ізотонічному розчині.

### МОНОВАЛЕНТНИЙ КЛІТИННИЙ ЗБІР

Проводять моніторинг стабільності виробництва за швидкістю зростання, рН, виходом і проявом характеристик фази 1 мікроорганізмів у культурі, таких як наявність фімбрій 2 і 3 та гемолітичної активності. Одиничні збори не використовують для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини, поки в них не підтверджена наявність клітин *B. pertussis*, що мають ті самі характеристики зростання й аглютиногени, що й початковомі штамми, а також відсутність контамінуючих бактерій та грибів.

Тільки моновалентний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися в подальшому виробництві.

**Чистота.** Перед інактивациєю випробовують зразки одиничних зборів; під мікроскопом Грам-зabarвлені мазки, або інокуляцією у підходящі середовища для культивування, або іншим підходящим методом.

**Каламутність.** Каламутність кожного одиничного збору визначають не пізніше як за 2 тижні після

## Вакцина для профілактики кашлюку (цільноклітинна, адсорбована)

збору і до того, як піддати бактеріальні суспензії будь-якій обробці, здатній змінити каламутність. Визначення проводять, порівнюючи з Міжнародним стандартним препаратом каламутності, який використовують як основу для розрахунку подальших стадій виробництва вакцин. Еквівалентність Міжнародних одиниць із Міжнародним стандартним препаратом каламутності встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

Можна використовувати метод спектрофотометрії (2.2.25), валідований щодо стандартного препарату каламутності, та визначати поглинання за довжини хвилі 600 нм.

### ІНАКТИВАЦІЯ І ДЕТОКСИКАЦІЯ СУСПЕНЗІЇ *B.PERTUSSIS*

Відразу після відбору проб із одиничних зборів на чистоту і визначення каламутності починають процес інактивації. Бактерії знищують і знешкоджують у контрольованих умовах за допомогою відповідної хімічної речовини або нагріванням, або комбінацією цих методів. Суспензії зберігають при температурі  $(5 \pm 3)$  °C протягом відповідного періоду для зменшення їх токсичності.

Тільки моновалентна нерозфасована клітинна суспензія, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування нерозфасованої кінцевої серії.

**Залишкові живі *B.pertussis*.** Інактивацію цілих клітин *B. pertussis* перевіряють підходящим середовищем для культивування.

**Наявність токсину кашлюку.** Наявність токсину кашлюку визначають аналізом СНО клітинної культури, використовуючи напівкількісний метод і межу, визначену для конкретного продукту.

**pH (2.2.3).** У встановлених для конкретного продукту межах.

**Ідентифікація.** Проводять визначенням аглютинації або підходящим методом імунодифузії.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Каламутність.** Каламутність кожного одиничного збору визначають на кінцевій фазі в кінці основного процесу ферментації, порівнюючи з Міжнародним стандартним препаратом каламутності, який використовують як основу для розрахунку подальших стадій виробництва вакцин. Еквівалентність Міжнародних одиниць з Міжнародним стандартним препаратом каламутності встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я. Поглинання, виміряне за довжини хвилі 600 нм (2.2.25), має бути в межах, встановлених для конкретного продукту.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Підходжі кількості інактивованих одиничних зборів об'єднують для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

Склад послідовних серій кінцевої нерозфасованої вакцини при використанні 2 або більше штамів *B. pertussis* має бути таким самим, що і співвідношення кожного штаму, виміряного в одиницях каламутності. Концентрація бактерій у кінцевій нерозфасованій вакцині не має перевищувати 20 МО каламутності в одній дозі для людини. Каламутність одиничного збору використовують для розрахунку концентрації бактерій у кінцевій нерозфасованій вакцині. До клітинної суспензії додають мінеральний адсорбент, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат. Можуть бути додані підходжі антимікробні консерванти. Фенол не використовують як консервант.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Фімбрії.** Кожну нерозфасовану серію до додавання адсорбенту контролюють на наявність фімбрій 2 і 3 для підтвердження відповідної експресії у процесі бактеріального росту.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на специфічну токсичність, вільний формальдегід, антимікробні консерванти, кількісне визначення й одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

У випробовуваній вакцині розчиняють достатню кількість *натрію цитрату* *R* для одержання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при тем-

пературі 37 °С близько 16 год і центрифугують для одержання бактеріального преципітату. Ідентифікують вакцину для профілактики кашлюку зглютинацією бактерій із ресуспендованого преципітату специфічною до *B. pertussis* імуносироваткою або іншим підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

### ВИПРОБУВАННЯ

**Специфічна токсичність.** Використовують дві групи тварин, не менше 5 здорових мишей в кожній, масою від 14 г до 16 г для введення вакцини і контролю з використанням фізіологічного розчину. Підбирають мишей однієї статі або самок і самців, рівномірно розподіляючи по групах. Кожній миші піддодслідної групи внутрішньочеревно вводять по 0.5 мл вакцини, що містить кількість вакцини, еквівалентну половині однієї дози для людини. Кожній миші контрольної групи вводять по 0.5 мл стерильного розчину 9 г/л *натрію хлориду Р*, що переважно містить ту саму кількість антимікробних консервантів, що і випробовувана вакцина. Кожну групу мишей зважують безпосередньо перед випробуванням, через 72 год і 7 діб після ін'єкції. Вакцина витримує випробування, якщо виконуються всі три умови:

- через 72 год після ін'єкції загальна маса вакцинованих мишей не менша маси мишей до ін'єкції;
- через 7 діб після ін'єкції середнє збільшення маси на одну вакциновану мишу складає не менше 60 % від маси контрольної миші;
- не більше 5 % вакцинованих мишей гине в ході випробування.

Якщо випробування проводять на 5 мишах і гине одна вакцинована миша, можна повторювати випробування, використовуючи 15 мишей, і результати двох випробувань можна об'єднувати.

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вільний формальдегід (2.4.12).** Не більше 0.2 г/л, де застосовно.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективною кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

**Стерильність (2.6.1).** Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення проводять методом визначення вакцини для профілактики кашлюку (цільноклітинної) (2.7.7).

Установлена активність має бути не менше 4.0 МО на одну дозу для людини, і нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 2.0 МО на одну дозу для людини.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- використаний метод інактивації;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КОРУ (ЖИВА)

*Vaccinum morbillorum vivum*

### MEASLES VACCINE (LIVE)

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики кору (жива) — ліофілізований препарат відповідним чином атенуйованого штаму вірусу кору. Вакцину безпосередньо перед застосуванням розчиняють, як зазначено в інструкції із застосування, отримуючи прозору рідину, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

### ВИРОБНИЦТВО

Виробництво вакцини засноване на системі посівних серій вірусу та системі банку клітин, якщо вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах. Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою для людини. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж вірус, який використовувався для приготування вакцини, що в клінічних випробуваннях продемонструвала задовільні результати з безпеки та ефективності; навіть з дозволеними виключеннями кількість пасажів зверх рівня, використаного в клінічних випробуваннях, не має перевищувати 5.

У процесі доклінічної розробки на основі наявних епідеміологічних даних про нейровірулентність і нейротропізм перш за все початкового дикого типу вірусу розглядають потенційну нейровірулентність

## Вакцина для профілактики кору (жива)

штаму вакцин. У світлі цього проводять аналіз ризику. Якщо необхідно і можливо, проводять випробування штаму вакцин, використовуючи тваринні моделі, які диференціюють початковий тип і атенуований вірус; можуть знадобитися випробування проміжних атенуованих штамів.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСІВ

Вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах (5.2.3) або в культурі клітин курячих ембріонів із курячих зграй, вільних від специфічних патогенів (5.2.2).

### ПОСІВНІ СЕРІЇ

Використаний штам вірусу кору слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним. Посівні серії вірусу готують у великих кількостях і зберігають при температурі нижче  $-20^{\circ}\text{C}$ , якщо вони ліофілізовані, або нижче  $-60^{\circ}\text{C}$ , якщо вони не ліофілізовані.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** Вірус кору, що міститься у кожній головній і робочій посівних серіях, ідентифікують нейтралізацією в культурі клітин сироваткою із використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Для контролю відтворюваності виробництва визначають концентрацію вірусу в кожній головній і робочій посівних серіях.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Робоча посівна серія має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять в асептичних умовах на ділянці, де не обробляються інші клітини. Середовище для культивування клітин може містити підхожі сироватки тварин (але не сироватку людини), але кінцеве середовище для підтримки росту клітин при розмноженні вірусу не має містити сироватку тварин. Сироватка та трипсин, використовувані для приготування клітинної суспензії та середовища для культивування, мають бути вільні від сторонніх агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий

як феноловий червоний, та підхожі антибіотики в найменшій ефективній концентрації. У виробництві бажано використовувати субстрати, вільні від антибіотиків. Не менше 500 мл культури клітин для виробництва вакцини відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини). У відповідний для використаного вірусного штаму час збирають вірусні суспензії.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Ідентифікація.** Одиничний збір має містити вірус кору, ідентифікований нейтралізацією в культурі клітин сироваткою з використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу в одиничному зборі визначають, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для контролю відтворюваності виробництва та для визначення розведення, яке необхідне для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини.** Якщо для виробництва використовують людські диплоїдні клітини, контрольні клітини мають витримувати випробування з ідентифікації і вимоги випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Збори вірусів, що витримують наведені вище випробування, об'єднують й очищують, видаляючи клітини. Можуть бути додані підхожі стабілізатори, і об'єднані збори можуть розбавлятися відповідним чином.

Тільки кінцева нерозфасована серія вакцини, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) з використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Виходячи з результатів стабільності, встановлюють мінімальну концентрацію вірусу в момент випуску, яка забезпечить зазначену на етикетці мінімальну концентрацію вірусу в кінці терміну придатності.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги щодо мінімальної концентрації вірусу в момент випуску, вимоги щодо термічної стабільності та вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація» і «Випробування», може бути випущена для

застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведено випробування на альбумін бичачий сироватковий і одержані задовільні результати, це випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**Термічна стабільність.** Не менше трьох флаконів ліофілізованої вакцини кінцевої серії в сухому стані витримують при температурі  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 7 діб. Паралельно проводять визначення концентрації вірусу, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для підігрітої вакцини та для вакцини, яку зберігають при рекомендованій температурі зберігання. Концентрація вірусу в підігрітій вакцині має бути не більше як на  $1.0 \log$  нижче концентрації вірусу в невідігрітій вакцині.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вакцина, розчинена відповідно до інструкції із застосування, при змішуванні зі специфічними антитілами проти вірусу кору перестає бути інфекційною для культури клітин, сприйнятливих до даного вірусу.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Відсутність бактерій та грибів.** Розчинена вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше 50 нг на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Вода (2.5.12).** Не більше 3.0 %. Визначення проводять напівмікрометодом визначення води.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають титр інфекційного вірусу методом розведення, використовуючи не менше трьох окремих флаконів вакцини та інокуючи відповідну кількість лунок для кожного кроку розведення. Один флакон відповідного стандартного препарату вірусу титрують у трьох повторах для валідації кожного визначення. Концентрацію вірусу в стандартному препараті перевіряють, використовуючи контрольну карту, і кожна лабораторія на основі архівних даних установлює титр. При використанні стандартного препарату підприємства встановлюють його відповідність із Фармакопейним біологічним стандартним препаратом і регулярно контролюють цю відповідність. Розраховують концентрацію вірусу в кожному флаконі вакцини і для кожного повтору стандартного препарату, а також відповідну усереднену концентрацію вакцини, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3). Усереднена концентрація вірусу для трьох

флаконів вакцини має бути не менше зазначеної на етикетці; мінімальна концентрація вірусу, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.0 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленної концентрації вірусу стандартного препарату для трьох повторів більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ;
- концентрація вірусу стандартного препарату відрізняється від заявленого рівня більше як на  $0.5 \log \text{CCID}_{50}$ .

Випробування повторюють, якщо довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації вакцини більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ; об'єднують тільки результати вірогідних визначень звичайними статистичними методами (наприклад, наведені в статті 5.3) для розрахунку концентрації вірусу в зразку. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації має бути не більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ .

*БСП вакцини для профілактики кору (живої)* придатний для застосування як стандартний препарат.

В обґрунтованих і дозволених випадках можна використовувати інші варіанти кількісного визначення, що може припускати застосування критеріїв вірогідності та придатності, відмінних від наведених вище. У будь-якому разі вакцина має витримувати наведене вище випробування при тестуванні.

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- штамп вірусу, використаного для приготування вакцини;
- тип і походження клітин, використаних для приготування вакцини;
- мінімальну концентрацію вірусів;
- слід уникати контакту між вакциною і дезинфікуючим засобом.



**ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ  
КОРУ, ПАРОТИТУ ТА КРАСНУХИ  
(ЖИВА)****Vaccinum morbillorum, parotitidis et  
rubellae vivum****MEASLES, MUMPS AND RUBELLA VACCINE (LIVE)****ВИЗНАЧЕННЯ**

Вакцина для профілактики кору, паротиту та краснухи (жива) — ліофілізований препарат відповідним чином атенуйованих штамів вірусу кору, паротиту та краснухи.

Вакцину безпосередньо перед застосуванням розчиняють, як зазначено в інструкції із застосування, отримуючи прозору рідину, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

**ВИРОБНИЦТВО**

Три компонента готують, як зазначено в статтях «Вакцина для профілактики корі (жива)», «Вакцина для профілактики краснухи (жива)» і «Вакцина для профілактики паротиту (жива)», і вони мають витримувати вимоги, наведені в цих статтях.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

**КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА**

Збори вірусів кожного компонента об'єднують і очищають, видаляючи клітини. Можуть бути додані підходящі стабілізатори, і об'єднані збори можуть розбавлятися відповідним чином. Змішують відповідні кількості об'єданого збору кожного компонента.

Тільки кінцева нерозфасована серія вакцини, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) з використанням 10 мл для кожного середовища.

**КІНЦЕВА СЕРІЯ**

Для кожного компонента, виходячи з результатів стабільності, встановлюють мінімальну концентра-

цію вірусу в момент випуску, яка забезпечить зазначену на етикетці мінімальну концентрацію вірусу в кінці терміну придатності.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги щодо мінімальної концентрації вірусу в момент випуску, вимоги щодо термічної стабільності та вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація» і «Випробування», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведене випробування на альбумін бичачий сироватковий і одержані задовільні результати, це випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**Термічна стабільність.** Не менше трьох флаконів ліофілізованої вакцини кінцевої серії в сухому стані витримують при температурі  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 7 діб. Паралельно проводять визначення концентрації вірусу, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для підігрітої вакцини та для вакцини, яку зберігають при рекомендованій температурі зберігання. Концентрація вірусу в підігрітій вакцині має бути не більше як на 1.0 log нижче концентрації вірусу в невідігрітій вакцині.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

Вакцина, розчинена відповідно до інструкції з застосування, при змішуванні зі специфічними антитілами проти вірусу кору, паротиту та краснухи перестає бути інфекційною для культури клітин, сприйнятливих до даного вірусу. Вакцина, розчинена відповідно до інструкції із застосування, при змішуванні з достатньою кількістю специфічних антитіл проти будь-яких двох компонентів вакцини перестає бути інфекційною, а третій компонент вакцини інфікує культуру клітин, сприйнятливих до даного вірусу.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Відсутність бактерій та грибів.** Розчинена вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше 50 нг на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Овальбумін.** Якщо паротитний компонент вакцини вироблений в курячих ембріонах, вона має містити не більше 1 мкг овальбуміну на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Вода (2.5.12).** Не більше 3.0 %. Визначення проводять напівмікрометодом визначення води.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Вибирають клітинні лінії і/або нейтралізуючу протисироватку, що гарантує визначення кожного компонента без взаємодії з останніми двома компонентами.

Визначають титр інфекційного вірусу методом розведення, використовуючи не менше трьох окремих флаконів вакцини та інокулюючи відповідну кількість лунок для кожного кроку розведення. Один флакон відповідного стандартного препарату вірусу титрують у трьох повторах для валідації кожного визначення. Концентрацію вірусу в стандартному препараті перевіряють, використовуючи контрольну карту, і кожна лабораторія на основі архівних даних установлює титр. При використанні стандартного препарату підприємства встановлюють його відповідність із Фармакопейним біологічним стандартним препаратом і регулярно контролюють цю відповідність. Розраховують концентрацію вірусу в кожному флаконі вакцини і для кожного повтору стандартного препарату, а також відповідну усереднену концентрацію вакцини, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3).

Усереднена концентрація вірусів кору, паротиту та краснухи для трьох флаконів вакцини має бути не менше зазначеної на етикетці; мінімальна концентрація вірусу кору, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.0 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини; мінімальна концентрація вірусу паротиту, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.7 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини; мінімальна концентрація вірусу краснухи, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.0 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленної концентрації вірусу стандартного препарату для трьох повторів більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ;
- концентрація вірусу стандартного препарату відрізняється від заявленого рівня більше як на  $0.5 \log \text{CCID}_{50}$ .

Випробування повторюють, якщо довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації вакцини більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ; об'єднують тільки результати вірогідних визначень звичайними статистичними методами (наприклад, наведені в статті 5.3) для розрахунку концентрації вірусу в зразку. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації має бути не більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ .

*БСП вакцини для профілактики кору (живої) придатний для застосування як стандартний препарат.*

*БСП вакцини для профілактики паротиту (живої) придатний для застосування як стандартний препарат.*

*БСП вакцини для профілактики краснухи (живої) придатний для застосування як стандартний препарат.*

У обґрунтованих і дозволених випадках можна використовувати інші варіанти кількісного визначення, що може припускати застосування критеріїв вірогідності та придатності, відмінних від наведених вище. У будь-якому разі вакцина має витримувати наведене вище випробування при тестуванні.

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- штами вірусів, використаних для приготування вакцини;
- де застосовно, для виробництва вакцин використовують курячі ембріони;
- тип і походження клітин, використаних для приготування вакцини;
- мінімальну концентрацію вірусів кожного компонента;
- слід уникати контакту між вакциною і дезінфікуючим засобом.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КРАСНУХИ (ЖИВА)

*Vaccinum rubellae vivum*

### *RUBELLA VACCINE (LIVE)*

## ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики краснухи (жива) — ліофілізований препарат відповідним чином атенуйованого штаму вірусу краснухи. Вакцину безпосередньо перед застосуванням розчиняють, як зазначено в інструкції із застосування, отримуючи прозору рідину, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

## ВИРОБНИЦТВО

Виробництво вакцини засноване на системі посівних серій вірусу та системі банку клітин. Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю і безпекою для людини. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж вірус, який використовувався для приготування вакцини,

## Вакцина для профілактики краснухи (жива)

що в клінічних випробуваннях продемонструвала задовільні результати з безпеки та ефективності.

У процесі доклінічної розробки на основі наявних епідеміологічних даних про нейровірулентність і нейротропізм перш за все початкового дикого типу вірусу розглядають потенційну нейровірулентність штаму вакцин. У світлі цього проводять аналіз ризику. Якщо необхідно і можливо, проводять випробування штаму вакцин, використовуючи тваринні моделі, які диференціюють початковий тип і атенуований вірус; можуть знадобитися випробування проміжних атенуованих штамів.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСІВ

Вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах (5.2.3).

### ПОСІВНІ СЕРІЇ

Використаний штам вірусу краснухи слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним. Посівні серії вірусу готують у великих кількостях і зберігають при температурі нижче  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , якщо вони ліофілізовані, або нижче  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , якщо вони не ліофілізовані.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** Вірус краснухи, що міститься в кожній головній і робочій посівних серіях, ідентифікують нейтралізацією в культурі клітин сироваткою з використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Для контролю відтворюваності виробництва визначають концентрацію вірусу в кожній головній і робочій посівних серіях.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Робоча посівна серія має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять в асептичних умовах на ділянці, де не обробляються інші клітини. Середовище для культивування клітин може містити підходящі сироватки тварин (але не сироватку людини), але кінцеве середовище для підтримки росту клітин при розмноженні вірусу не має містити сироватку тварин. Сироватка та трипсин, викорис-

товувані для приготування клітинної суспензії та середовища для культивування, мають бути вільні від сторонніх агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підходящі антибіотики в найменшій ефективній концентрації. У виробництві бажано використовувати субстрати, вільні від антибіотиків. Не менше 500 мл культури клітин для виробництва вакцини відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини). У процесі росту клітин контролюють температуру інокуляції. Вірусну суспензію збирають один раз або частіше протягом 28 діб. Декілька зборів із однієї виробничої культури клітин можуть об'єднуватися і вважатися як одиничний збір.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Ідентифікація.** Одиничний збір має містити вірус краснухи, ідентифікований нейтралізацією в культурі клітин сироваткою з використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу в одиничному зборі визначають, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для контролю відтворюваності виробництва та для визначення розведення, яке необхідне для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини.** Контрольні клітини мають витримувати випробування з ідентифікації і вимоги випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Одиничні збори, що витримують наведені вище випробування, об'єднують й очищують, видаляючи клітини. Можуть бути додані підходящі стабілізатори, і об'єднані збори можуть розбавлятися відповідним чином.

Тільки кінцева нерозфасована серія вакцини, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) з використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Виходячи з результатів стабільності, встановлюють мінімальну концентрацію вірусу в момент випуску, яка забезпечить зазначену на етикетці мінімальну концентрацію вірусу в кінці терміну придатності.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги щодо мінімальної концентрації вірусу в момент випуску, вимоги щодо термічної стабільності та вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація» і «Випробування», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведене випробування на альбумін бичачий сироватковий і одержані задовільні результати, це випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**Термічна стабільність.** Не менше трьох флаконів ліофілізованої вакцини кінцевої серії в сухому стані витримують при температурі  $(37 \pm 1)$  °C протягом 7 діб. Проводять визначення концентрації вірусу, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», паралельно для підігрітої вакцини та для вакцини, яку зберігають при рекомендованій температурі зберігання. Концентрація вірусу в підігрітій вакцині має бути не більше як на  $1.0 \log$  нижче концентрації вірусу в невідігрітій вакцині.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вакцина, розчинена відповідно до інструкції із застосування, при змішуванні зі специфічними антитілами проти вірусу краснухи перестає бути інфекційною для культури клітин, сприйнятливих до даного вірусу.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Відсутність бактерій та грибів.** Розчинена вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше 50 нг на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Вода (2.5.12).** Не більше 3.0 %. Визначення проводять напівмікрометодом визначення води.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають титр інфекційного вірусу методом розведення, використовуючи не менше трьох окремих флаконів вакцини та інокуючи відповідну кількість лунок для кожного кроку розведення. Один флакон відповідного стандартного препарату вірусу титрують у трьох повторях для валідації кожного визначення. Концентрацію вірусу в стандартному препараті перевіряють, використовуючи контрольну карту, і кожна лабораторія на основі архівних даних установлює титр. При використанні стандартного препарату підприємства встановлюють його відповідність із Фармакопейним біологічним стандартним препаратом і регулярно контролюють цю

відповідність. Розраховують концентрацію вірусу в кожному флаконі вакцини і для кожного повтору стандартного препарату, а також відповідну усереднену концентрацію вакцини, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3). Усереднена концентрація вірусу для трьох флаконів вакцини має бути не менше зазначеної на етикетці; мінімальна концентрація вірусу, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.0 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленої концентрації вірусу стандартного препарату для трьох повторів більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ;
- концентрація вірусу стандартного препарату відрізняється від заявленого рівня більше як на  $0.5 \log \text{CCID}_{50}$ .

Випробування повторюють, якщо довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації вакцини більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ; об'єднують тільки результати вірогідних визначень звичайними статистичними методами (наприклад, наведені в статті 5.3) для розрахунку концентрації вірусу в зразку. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації має бути не більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ .

*БСП вакцини для профілактики краснухи (живої)* придатний для застосування як стандартний препарат.

В обґрунтованих і дозволених випадках можна використовувати інші варіанти кількісного визначення, що може припускати застосування критеріїв вірогідності та придатності, відмінних від наведених вище. У будь-якому разі вакцина має витримувати наведене вище випробування при тестуванні.

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- штамп вірусу, використаного для приготування вакцини;
- тип і походження клітин, використаних для приготування вакцини;
- мінімальну концентрацію вірусів;
- слід уникати контакту між вакциною і дезінфікуючим засобом.

**ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ  
ПАРОТИТУ (ЖИВА)****Vaccinum parotitidis vivum****MUMPS VACCINE (LIVE)****ВИЗНАЧЕННЯ**

Вакцина для профілактики паротиту (жива) — ліофілізований препарат відповідним чином атенуваного штаму вірусу паротиту. Вакцину безпосередньо перед застосуванням розчиняють, як зазначено в інструкції із застосування, отримуючи прозору рідину, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

**ВИРОБНИЦТВО**

Виробництво вакцини засноване на системі посівних серій вірусу та системі банку клітин, якщо вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах. Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою для людини. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж вірус, який використовувався для приготування вакцини, що в клінічних випробуваннях продемонструвала задовільні результати з безпеки та ефективності.

У процесі доклінічної розробки на основі наявних епідеміологічних даних про нейровірулентність і нейротропізм перш за все початкового дикого типу вірусу розглядають потенційну нейровірулентність штаму вакцин. У світлі цього проводять аналіз ризику. Якщо необхідно і можливо, проводять випробування штаму вакцин, використовуючи тваринні моделі, які диференціюють початковий тип й атенуований вірус; можуть знадобитися випробування проміжних атенуованих штамів.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

**СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСІВ**

Вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах (5.2.3), або в культурі клітин курячих ембріонів, або з амніотичної порожнини курячих ембріонів із курячих згай, вільних від специфічних патогенів (5.2.2).

**ПОСІВНІ СЕРІЇ**

Використаний штам вірусу паротиту слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про його походження і подальші маніпуляції з ним. Посівні серії вірусу готують у великих кількостях і зберігають при температурі нижче  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , якщо вони ліофілізовані, або нижче  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , якщо вони не ліофілізовані.

Тільки посівна серія, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** Вірус паротиту, що міститься в кожній головній і робочій посівних серіях, ідентифікують нейтралізацією в культурі клітин сироваткою з використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Для контролю відтворюваності виробництва визначають концентрацію вірусу в кожній головній і робочій посівних серіях.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Робоча посівна серія має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

**РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР**

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять в асептичних умовах на ділянці, де не обробляються інші клітини. Середовище для культивування клітин може містити підходи сироватки тварин (але не сироватку людини). Сироватка та трипсин, використовувані для приготування клітинної суспензії та середовища для культивування, мають бути вільні від сторонніх агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підходи антибіотики в найменшій ефективній концентрації. У виробництві бажано використовувати субстрати, вільні від антибіотиків. Не менше 500 мл культури клітин для виробництва вакцини відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини). Якщо вірус розмножують у курячих ембріонах, 2 %, але не менше 20 яєць відбирають як неінфіковані контрольні яйця. У відповідний для використаного вірусного штаму час збирають вірусні суспензії.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Ідентифікація.** Одиничний збір має містити вірус паротиту, ідентифікований нейтралізацією в культурі клітин сироваткою з використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу в одиничному зборі визначають, як зазначено в розділі «Кіль-

кінце визначення», для контролю відтворюваності виробництва та для визначення розведення, яке необхідне для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Сторонні агенти (2.6.16).** Одиничний збір має витримувати вимоги випробування на сторонні агенти.

**Контрольні клітини або яйця.** Якщо для виробництва використовують людські диплоїдні клітини, контрольні клітини мають витримувати випробування з ідентифікації. Контрольні клітини та контрольні яйця мають витримувати вимоги випробування на сторонні агенти (2.6.16).

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Одиничні збори, що витримують наведені вище випробування, об'єднують і очищають, видаляючи клітини. Можуть бути додані підходящі стабілізатори, і об'єднані збори можуть розбавлятися відповідним чином.

Тільки кінцева нерозфасована серія вакцини, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) з використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Виходячи з результатів стабільності, встановлюють мінімальну концентрацію вірусу в момент випуску, яка забезпечить зазначену на етикетці мінімальну концентрацію вірусу в кінці терміну придатності.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги щодо мінімальної концентрації вірусу в момент випуску, вимоги щодо термічної стабільності та вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація» і «Випробування», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведено випробування на альбумін бичачий сироватковий і одержані задовільні результати, це випробування можна пропустити для кінцевої серії.

**Термічна стабільність.** Не менше трьох флаконів ліофілізованої вакцини кінцевої серії в сухому стані витримують при температурі  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 7 діб. Паралельно проводять визначення концентрації вірусу, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для підігрітої вакцини та для вакцини, яку зберігають при рекомендованій температурі зберігання. Концентрація вірусу в підігрітій вакцині має бути не більше як на  $1.0 \log$  нижче концентрації вірусу в невідігрітій вакцині.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Вакцина, розчинена відповідно до інструкції із застосування, при змішуванні зі специфічними антитілами проти вірусу паротиту перестає бути інфекційною для культури клітин, сприйнятливих до даного вірусу.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Відсутність бактерій та грибів.** Розчинена вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Альбумін бичачий сироватковий.** Не більше 50 нг на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Овальбумін.** Якщо вакцина вироблена в курячих ембріонах, вона має містити не більше 1 мкг овальбуміну на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

**Вода (2.5.12).** Не більше 3.0 %. Визначення проводять напівмікрометодом визначення води.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають титр інфекційного вірусу методом розведення, використовуючи не менше трьох окремих флаконів вакцини та інокулюючи відповідну кількість лунок для кожного кроку розведення. Один флакон відповідного стандартного препарату вірусу титрують у трьох повторях для валідації кожного визначення. Концентрацію вірусу в стандартному препараті перевіряють, використовуючи контрольну карту, і кожна лабораторія на основі архівних даних установлює титр. При використанні стандартного препарату підприємства встановлюють його відповідність із Фармакопейним біологічним стандартним препаратом і регулярно контролюють цю відповідність. Розраховують концентрацію вірусу в кожному флаконі вакцини і для кожного повтору стандартного препарату, а також відповідну усереднену концентрацію вакцини, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3). Усереднена концентрація вірусу для трьох флаконів вакцини має бути не менше зазначеної на етикетці; мінімальна концентрація вірусу, зазначена на етикетці, має бути не менше  $3.7 \log \text{CCID}_{50}$  на одну дозу для людини.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установлені концентрації вірусу стандартного препарату для трьох повторів більше як на  $(\pm 0.3) \log \text{CCID}_{50}$ ;
- концентрація вірусу стандартного препарату відрізняється від заявленого рівня більше як на  $0.5 \log \text{CCID}_{50}$ .

## Вакцина для профілактики поліомієліту (інактивована)

Випробування повторюють, якщо довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації вакцини більше як  $(\pm 0.3) \log CCID_{50}$ ; об'єднують тільки результати вірогідних визначень звичайними статистичними методами (наприклад, наведені в статті 5.3) для розрахунку концентрації вірусу в зразку. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації має бути не більше як на  $(\pm 0.3) \log CCID_{50}$ .

*БСП вакцини для профілактики паротиту (живої)* придатний для застосування як стандартний препарат.

В обґрунтованих і дозволених випадках можна використовувати інші варіанти кількісного визначення, що може припускати застосування критеріїв вірогідності та придатності, відмінних від наведених вище. У будь-якому разі вакцина має витримувати наведене вище випробування при тестуванні.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- штамп вірусу, використаного для приготування вакцини;
- що вакцина була одержана в курячих ембріонах або тип і походження клітин, використаних для приготування вакцини;
- мінімальну концентрацію вірусів;
- слід уникати контакту між вакциною і дезінфікуючим засобом.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПОЛІОМІЄЛІТУ (ІНАКТИВОВАНА)

### Vaccinum poliomyelitidis inactivatum

#### *POLIOMYELITIS VACCINE (INACTIVATED)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики поліомієліту (інактивована) — рідкий препарат відповідних штамів поліовірусу людини типів 1, 2 і 3, вирощених у відповідних культурах клітин і інактивованих валідованим методом. Це прозора рідина, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

### ВИРОБНИЦТВО

Слід підтвердити, що спосіб виробництва гарантує стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою для людини.

Виробництво вакцин засноване на системі посівних серій вірусу. Використовують клітинні лінії відповідно до системи банку клітин. Якщо використовують первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп, виробництво має витримувати вимоги, наведені нижче.

Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше пасажів, ніж вірус, який використовувався для приготування вакцини, що в клінічних випробуваннях продемонструвала задовільні результати з безпеки та ефективності.

Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме випробування на аномальну токсичність (2.6.9) для імуносироваток і вакцин для застосування людиною.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСУ

Вірус розмножують у людських диплоїдних клітинах (5.2.3), безперервних клітинних лініях (5.2.3) або первинних, вторинних або третинних клітинах нирок мавп.

**Первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп.** Нижче наведені спеціальні вимоги для первинних, вторинних або третинних клітин нирок мавп.

*Мавпи, яких використовують для приготування культур клітин нирок для виробництва та контролю вакцин.* Використовувані тварини мають бути видів, дозволених компетентним уповноваженим органом, здоровими і, якщо немає інших зазначень і дозволів, такими, що раніше не використовувалися в експериментах. Клітини нирок для виробництва і контролю вакцин отримують не з диких тварин, а від мавп, що утримуються в неволі в контрольованих, закритих колоніях; заздалегідь перевірені посівні серії, приготовані з використанням вірусів, що пройшли пасажі в клітинах диких мавп, можуть бути дозволені компетентним уповноваженим органом для застосування у виробництві вакцин, якщо архівними даними підтверджена їх безпека.

*Контрольовані, закриті колонії мавп.* Мавп групами утримують у клітках. Відсутність сторонніх агентів досягається використанням тварин, що знаходяться у закритих колоніях, які перебувають під постійним і систематичним ветеринарним і лабораторним спостереженням за наявністю інфекційних агентів. Постачальник тварин має бути сертифікований уповноваженим органом. Серологічні дослідження кожної мавпи проводять через регулярні інтервали впродовж періоду карантину не менше 6 тижнів до і після введення тварини в колонію.

Слід показати, що використані мавпи туберкулін-негативні та вільні від антитіл до вірусу 40 мавп (SV40) і вірусу імунодефіциту мавп. Пробу крові для тесту на антитіла SV40 слід відбирати якомога ближче до дати забору нирок. Якщо для виробництва використовують мавп *Macaca spp.* слід підтвердити

відсутність антитіл на вірус герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В). Людський вірус герпесу 1 використовують як індикатор для тестування відсутності антитіл до вірусу герпесу В через небезпеку перенесення вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В).

Мавп, у яких мають видалити нирки, ретельно обстежують, особливо на предмет інфекції туберкульозу та вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В). При виявленні в них будь-якого патологічного ураження, значущого для використання нирок у приготуванні посівної серії вакцин, тварину та всіх інших тварин цієї групи не використовують до додаткового підтвердження безпеки продукту.

Усі операції, зазначені в цьому розділі, проводять поза ділянкою виробництва вакцин.

**Культури клітин мавп для виробництва вакцин.** Для приготування культури клітин використовують нирки без патологічних ознак. Кожна група культур клітин, отримана з однієї мавпи, формує окрему виробничу культуру клітин, з якої отримують окремий одиничний збір.

Суспензія первинних клітин нирок мавп має витримувати випробування на мікобактерії (2.6.2); перед проведенням випробування клітини слід руйнувати.

При використанні вторинних або третинних клітин слід підходити валідованими методами підтвердити, що культури клітин зверх рівня пасажу, використаного у виробництві, не канцерогенні.

## ПОСІВНІ СЕРІЇ

Кожен з трьох використовуваних штамів поліовірусів слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про їх походження і подальші маніпуляції з ними.

Тільки робоча посівна серія, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** У кожній робочій посівній серії ідентифікують поліовірус людини типів 1, 2 або 3 нейтралізацією вірусу в культурі клітин специфічними антитілами.

**Концентрація вірусу.** У кожній робочій посівній серії визначають концентрацію вірусу для встановлення кількості вірусу, необхідної для інокуляції культури клітин у виробництві.

**Сторонні агенти.** Робоча посівна серія має витримувати вимоги до посівної серії щодо вірусних вакцин (2.6.16). Крім того, якщо для виділення штамів використовують первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп, слід вжити заходів із забезпечення чистоти штамів від вірусів мавп, таких як вірус імунодефіциту мавп, вірус 40 мавп, філовіруси і вірус герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В). Робоча посівна серія, отримана в первинних, вторинних або

третинних клітинах нирок мавп, має витримувати вимоги, наведені нижче в розділі «Розмноження і збір», для одиничних зборів, приготованих у таких клітинах.

## РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять в асептичних умовах на ділянці, де не обробляються інші клітини або віруси. Середовище для культивування клітин може містити підходячі сироватки тварин (але не сироватку людини). Сироватка та трипсин, використовувані для приготування клітинної суспензії та середовища для культивування, мають бути вільні від сторонніх агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підходячі антибіотики в найменшій ефективній концентрації. Не менше 500 мл культури клітин для виробництва вакцин відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини); у разі застосування у виробництві у ферментері безперервної клітинної лінії як контрольні клітини відбирають  $200 \times 10^6$  клітин; у разі застосування у виробництві первинних, вторинних або третинних клітин нирок мавп як контрольні клітини відбирають зразок клітин, еквівалентний не менше 500 мл клітинної суспензії, у концентрації, використаній у виробництві.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування вакцин. Випробування з ідентифікації та відсутності бактерій і грибів можуть проводитися на очищеному, об'єднаному моновалентному зборі. Після демонстрації відтворюваності виробництва на стадії одиничного збору випробування з визначення концентрації вірусу можна виключити і проводити на очищеному, об'єднаному моновалентному зборі.

**Контрольні клітини.** Контрольні клітини виробничої культури клітин мають витримувати випробування з ідентифікації (якщо для виробництва використовують систему банку клітин) та вимоги щодо сторонніх агентів (2.6.16); якщо використовують первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп, випробування в культурах клітин проводять, як зазначено в розділах «Випробування в культурі клітин нирок кролика» і «Випробування в культурі клітин нирок *cercopithecus*».

**Випробування в культурі клітин нирок кролика.** Тестують зразок не менше 10 мл об'єднаної надосадової рідини з контрольних клітин на відсутність вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В) і інших вірусів інокуляцією в культуру клітин нирок кролика. Розведення надосадової рідини в живильному середовищі має бути не більше 1:4. Площа клітинної поверхні має бути не менше  $3 \text{ cm}^2/\text{мл}$  інокуляту. З кожної партії клітин із тим самим середовищем один або більше контейнерів відбирають як неінокульовані



## Вакцина для профілактики поліомієліту (інактивована)

контрольні клітини. Культури інкубують при температурі 37 °С і спостерігають протягом не менше 2 тижнів. Результати випробування вважають невірними, якщо більше 20 % контрольних культур клітин забраковані з неспецифічних, випадкових причин.

**Випробування в культурі клітин нирок *cercopithecus*.** Тестують зразок не менше 10 мл об'єднаної надосадової рідини з контрольних клітин на відсутність вірусу SV40 і інших сторонніх агентів інокуляцією в культуру клітин нирок *cercopithecus* або інші клітини, для яких показана принаймні чутливість до вірусу SV40, з використанням методу, зазначеного в розділі «Випробування в культурі клітин нирок кролика». Результати випробування вважають невірними, якщо більше 20 % контрольних культур клітин забраковані з неспецифічних, випадкових причин.

**Ідентифікація.** Ідентифікують поліовірус людини типів 1, 2 або 3 в одиничному зборі нейтралізацією вірусу в культурі клітин специфічними антитілами.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу в кожному одиничному зборі визначають титруванням в культурі клітин інфекційного вірусу.

**Відсутність бактерій та грибів.** Одиничний збір має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Мікоплазми (2.6.7).** Одиничний збір має витримувати випробування на мікоплазми з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Випробування в культурі клітин нирок кролика.** Якщо у виробництві використовують первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп, не менше 10 мл одиничного збору тестують на відсутність вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В) і інших вірусів інокуляцією в культуру клітин нирок кролика, як зазначено для контрольних клітин.

**Випробування в культурі клітин нирок *cercopithecus*.** Якщо у виробництві використовують первинні, вторинні або третинні клітини нирок мавп, не менше 10 мл одиничного збору тестують на відсутність вірусу SV40 і інших сторонніх вірусів. Зразок нейтралізують антисироваткою з високим титром проти специфічних типів поліовірусу. Зразок випробовують у культурі первинних клітин нирок *cercopithecine* або клітин, для яких підтверджена чутливість принаймні до вірусу SV40. Культуру клітин інкубують при температурі 37 °С і спостерігають протягом не менше 14 діб. В кінці цього періоду готують хоча б одну субкультуру рідини в тій самій системі культури клітин і спостерігають як первинні клітини, так і субкультуру протягом ще 14 діб.

### ОЧИЩЕННЯ Й ОЧИЩЕНИЙ МОНОВАЛЕНТНИЙ ЗБІР

Декілька одиничних зборів одного типу можуть бути об'єднані та концентровані. Моновалентний збір

або об'єднані моновалентні збори очищають валідованими методами. Якщо у виробництві використовують безперервні клітинні лінії, слід підтвердити, що процес очищення постійно знижує вміст ДНК клітин-субстратів до рівня не більше 100 пг на одну дозу для людини.

Тільки очищений моновалентний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування інактивованого моновалентного збору.

**Ідентифікація.** Ідентифікують вірус нейтралізацією вірусу в культурі клітин, використовуючи специфічні антитіла або визначенням D-антигена.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу визначають титруванням інфекційного вірусу.

**Специфічна активність.** Співвідношення концентрації вірусу або вмісту D-антигена, визначене з використанням підходячого імунохімічного методу (2.7.1), до вмісту загального білка (специфічна активність) очищеного моновалентного збору має бути у встановлених для конкретного продукту межах.

### ІНАКТИВАЦІЯ Й ІНАКТИВОВАНИЙ МОНОВАЛЕНТНИЙ ЗБІР

Декілька очищених моновалентних зборів одного типу можуть бути об'єднані перед інактивацією. Для виключення невдач в інактивації через утворення вірусних агрегатів до і в процесі інактивації проводять фільтрування; інактивацію проводять протягом відповідного періоду, переважно не більше 24 год і у будь-якому разі не більше 72 год після попередньої фільтрації. Суспензію вірусу інактивують валідованим методом, який дозволяє інактивувати поліовірус без руйнування імуногенності; в ході валідаційних досліджень необхідно побудувати криву інактивації не менше 4 точками (наприклад, 0 год, 24 год, 48 год і 96 год), що показує зменшення в часі концентрації живих вірусів. Якщо для інактивації використовують формальдегід, слід перевірити відсутність надмірного формальдегіду в кінці періоду інактивації. Випробування кінетики інактивації, зазначені нижче, проводять на кожній партії для забезпечення відтворюваності процесів інактивації.

Тільки інактивований моновалентний збір, що витримує вимоги, наведені нижче, може використовуватися для приготування тривалентного пулу інактивованих моновалентних зборів або кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Тест на ефективність інактивації.** Після нейтралізації формальдегіду натрію бісульфітом (де можливо) перевіряють відсутність залишкових живих поліовірусів інокуляцією на підходжій культурі клітин по 2 зразки кожного моновалентного збору, відповідного не менше 1500 дозам для людини. Клітини,

використовувани для випробування, повинні мати оптимальну чутливість відносно залишкових інфекційних поліовірусів, наприклад клітини нирок певних видів мавп (*Macaca*, *Cercopithecus* або *Papio*) або клітини Нер-2. Якщо використовують інші клітини, для них слід показати аналогічну з зазначеними вище клітинами чутливість. Один зразок відбирають не пізніше 3/4 періоду стадії інактивації, а інший — у кінці інактивації. Зразки інокулюють у клітинну культуру так, щоб розведення вакцини в живильному середовищі не перевищувало 1:4 і площа клітинної поверхні складала не менше 3 см<sup>2</sup>/мл інокуляту. Як не інокульовані контрольні клітини відбирають один або більше контейнерів з тим самим середовищем. За культурою клітин спостерігають протягом не менше 3 тижнів. З кожного контейнера проводять не менше 2 пасажів: один — за 1 тиждень до кінця періоду спостереження, інший — у кінці; для пасажів використовують супернатант клітинних культур і інокулюють як при отриманні початкового зразка. Субкультуру досліджують протягом не менше 2 тижнів. Не має виявлятися ознак розмноження поліовірусів у культурі клітин. У кінці періоду спостереження тестують чутливість використаних культур клітин, інокулюючи живі поліовіруси того самого типу, що були в інактивованому моновалентному зборі.

**Кінетика інактивації.** Установлюють кінетику інактивації і затверджують компетентним уповноваженим органом. Отримують відповідні дані з кінетики інактивації і контролюють відтворюваність процесів інактивації.

**Стерильність (2.6.1).** Інактивований моновалентний збір має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Вміст D-антигена.** Вміст D-антигена, визначений підходящим імунохімічним методом (2.7.1), має бути у встановлених для конкретного продукту межах.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють безпосередньо з інактивованих моновалентних зборів людського поліовірусу типів 1, 2 і 3 або з тривалентного пулу інактивованих моновалентних зборів. Можуть бути додані підходящі стабілізатори та антимікробні консерванти.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Стерильність (2.6.1).** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хі-

мічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на вільний формальдегід, антимікробні консерванти і *in vivo* кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

*In vivo* кількісне визначення можна не проводити, якщо для даного продукту і для кожного типу поліовірусів критерії прийнятності визначення D-антигена дають такі результати, що і *in vivo* кількісне визначення в плані прийнятності або відбракування партії. Це підтвердження має включати випробування недостатньо активних партій, проведене експериментально, якщо необхідно, наприклад нагріванням або іншими способами зниження імуногенної активності. У разі значних змін у процесах виробництва антигенів або готових лікарських засобів слід оцінити їх дію на *in vivo* і *in vitro* визначення і розглянути необхідність ревалідації.

Якщо для очищених моновалентних зборів або для моновалентних інактивованих зборів проведене випробування на визначення вмісту білка та показано, що кінцева серія міститиме не більше 10 мкг на одну дозу для людини, для кінцевої серії це випробування можна пропустити.

Якщо для тривалентного пулу інактивованого збору або кінцевої нерозфасованої серії вакцини проведене випробування на альбумін бичачий сироватковий і отримані задовільні результати, для кінцевої серії це випробування можна пропустити.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Підходящим імунохімічним методом (2.7.1), таким як визначення D-антигена твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA), показують, що вакцина містить людський поліовірус типів 1, 2 і 3.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Вільний формальдегід (2.4.18).** Не більше 0.2 г/л.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективною кількістю і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

## Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна)

Вміст білкового азоту (2.5.33, метод 2). Не більше 10 мкг на одну дозу для людини.

Альбумін бичачий сироватковий. Не більше 50 нг на одну дозу для людини. Визначення проводять підходящим імунохімічним методом (2.7.1).

Стерильність (2.6.1). Витримує випробування на стерильність.

Бактеріальні ендотоксини (2.6.14). Менше 5 МО на одну дозу для людини.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Вміст D-антигена. Як міра відтворюваності виробництва визначають вміст D-антигена для людського поліовірусу типів 1, 2 і 3 підходящим імунохімічним методом (2.7.1), використовуючи стандартний препарат, калібрований в одиницях D-антигена Європейської Фармакопеї. Для кожного типу вміст, виражений відносно кількості D-антигена, зазначеного на етикетці, має бути в межах, установлених для конкретного продукту. БСП вакцини для профілактики поліомієліту (інактивованої) калібрується в одиницях Європейської Фармакопеї і призначений для використання у визначенні D-антигена. Одиниця Європейської Фармакопеї еквівалентна Міжнародним одиницям.

*In vivo* випробування. Вакцина має витримувати *in vivo* кількісне визначення вакцини для профілактики поліомієліту (інактивованої) (2.7.20).

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- типи поліовірусів, що містяться у вакцині;
- номінальний вміст кожного типу (1, 2 і 3) вірусу в одиницях D-антигена Європейської Фармакопеї на одну дозу для людини;
- клітинний субстрат, використаний для приготування вакцини.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПОЛІОМІЄЛІТУ (ОРАЛЬНА)

### Vaccinum poliomyelitidis perorale

#### POLIOMYELITIS VACCINE (ORAL)

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна) — препарат дозволених штамів живого атенуованого поліовірусу типів 1, 2 або 3, вирощених *in vitro* в дозволених культурах клітин, що містять будь-який тип або комбінацію 3 типів штамів Sabin, представлений у формі, придатній для орального застосування.

Це прозора рідина, яка може бути забарвлена, якщо доданий індикатор рН.

#### ВИРОБНИЦТВО

Слід підтвердити, що штами вакцин і спосіб виробництва гарантують стабільний вихід вакцини з необхідною імуногенністю й безпекою для людини.

Виробництво вакцин засноване на системі посівних серій вірусу. Використовують клітинні лінії відповідно до системи банку клітин. Якщо використовують первинні клітини нирок мавп, виробництво має витримувати вимоги, наведені нижче. Якщо немає інших зазначень і дозволів, вірус у кінцевій вакцині від головної посівної серії має пройти не більше 2 пасажів.

#### СТАНДАРТНІ ПРЕПАРАТИ

БСП вакцини для профілактики поліомієліту (оральної) типів 1, 2 і 3 придатний як стандартний препарат для кількісного визначення.

Міжнародний стандартний препарат поліовірусу типу 2 (Sabin) для аналізу мутантів полімеразною ланцюговою реакцією (ПІР, PCR) і рестрикційно-ферментативним розщеплюванням (АМПРФР, MAPREC) і синтетичної ДНК поліовірусу типу 3 (Sabin) для MAPREC-визначень придатен для застосування у випробуваннях на генетичні маркери і молекулярних випробувань для контролю відтворюваності виробництва.

Стандартні препарати кожного типу поліовірусу Sabin вихідного (SO)+2 рівня пасажу, званий WHO (SO+2)/I для вірусу типу 1, WHO (SO+2)/II для вірусу типу 2 і WHO (SO+2)/III для вірусу типу 3, доступні для порівняння *in vivo* нейровірулентності з такими самими гомотипними вакцинами. Заявки на стандартні препарати ВООЗ для випробувань *in vivo* нейровірулентності слід направляти у ВООЗ.

Біологічні препарати, Женева, Швейцарія (WHO, Biologicals, Geneva, Switzerland).

У кожному випробуванні слід використовувати відповідні стандартні препарати.

### СУБСТРАТИ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ВІРУСУ

Вірус вирощують у людських диплоїдних клітинних лініях (5.2.3), у безперервних клітинних лініях (5.2.3) або первинній культурі клітин нирок мавп (зокрема серійно пересіяні первинні культури клітин нирок мавп).

**Первинні культури клітин нирок мавп.** Нижче наведені спеціальні вимоги до субстрату для розмноження вірусу стосовно первинних культур клітин нирок мавп.

*Мавпи, яких використовують для приготування первинних культур клітин нирок для виробництва та контролю вакцин.* Якщо вакцину виробляють у первинній культурі клітин нирок мавп, використовувати тварини мають бути видів, дозволених компетентним уповноваженим органом, здоровими, відібраними з закритих або суворо контрольованих колоній і такими, що раніше не використовувалися в експериментах.

Мавп утримують у добре сконструйованих клітках, у добре вентиляційованих приміщеннях, і, якщо можливо, клітки розташовують максимально віддалено одна від одної. Слід вжити відповідних заходів із запобігання перехресній інфекції між клітками. У кожній клітці утримують не більше 2 мавп і партнерів по клітці не міняють. Мавп утримують у крайні-виробнику вакцини в групах карантину протягом не менше 6 тижнів до використання. Карантинна група — це колонія відібраних, здорових мавп, що утримуються в одному приміщенні з окремими пристроями годування й очищення, не мають контакту з іншими мавпами в період карантину. Якщо в період карантину сумарна кількість смертей у постачанні, що складається із однієї або більше груп, досягає 5% (за винятком нещасних випадків або якщо причиною смерті було неінфекційне захворювання), всіх мавп з цього постачання продовжують тримати в умовах карантину ще протягом 6 тижнів. Мавп продовжують утримувати в ізоляції, як при карантині, навіть після закінчення карантинного періоду, аж до використання тварин. Після використання останньої мавпи з групи приміщення, де утримувалися тварини, слід ретельно почистити і знезаразити перед розміщенням у ньому нової групи тварин. Якщо використовують нирки недоношених мавп, матір тримають у карантині протягом періоду вагітності.

Мавп, у яких видаляють нирки, анестезують і ретельно обстежують, особливо на наявність туберкульозу й інфекції вірусу герпесу 1 *cercopithecinae* (вірус В).

При виявленні у них будь-якого патологічного ураження, значущого для використання нирок у при-

готуванні посівної серії вакцин, тварину і всіх інших тварин цієї групи не використовують до додаткового підтвердження безпеки продукту.

Усі операції, зазначені в цьому розділі, проводять поза ділянкою виробництва вакцин.

Слід підтвердити, що використані мавпи — вільні від антитіл до вірусу 40 мавп (SV40), вірусу імунodefіциту мавп і спумавірусів. Пробу крові для тесту на антитіла SV40 слід відбирати якомога ближче до дати забору нирок. Якщо для виробництва використовують мавп *Macaca spp*, слід підтвердити відсутність антитіл на вірус герпесу 1 *cercopithecinae* (вірус В). Людський вірус герпесу використовують як індикатор для тестування відсутності антитіл до вірусу В через небезпеку перенесення вірусу герпесу 1 *cercopithecinae* (вірусу В). Мавпи, яких використовують для отримання нових посівних серій, мають бути вільні від антитіл до цитомегаловірусу мавп (sCMV).

*Первинні культури клітин нирок мавп для виробництва вакцин.* Для приготування культури клітин використовують нирки без патологічних ознак. Якщо мавпи з колонії, яку тримають для виробництва вакцини, для розмноження вірусу можна використовувати серійно пересіяну культуру клітин нирок мавп із первинної культури клітин, а коли — ні, то культури клітин нирок мавп не вирощують серіями. Вірус для приготування вакцини вирощують у таких культурах в асептичних умовах. Якщо для розмноження клітин використовують сироватку тварин, то середовище для підтримки після інокуляції вірусу не має містити сироватку.

Кожну групу культур клітин, отриману з однієї мавпи або приплодів не більше 10 недоношених мавп, готують і випробовують як окрему групу.

### ПОСІВНІ СЕРІЇ ВІРУСУ

Штами поліовірусів, використовуваних для приготування головної посівної серії, слід ідентифікувати архівними записами, які містять інформацію про їх походження і подальші маніпуляції з ними.

Робочі посівні серії готують шляхом одноразового пасажу з головної посівної серії і на затвердженому рівні пасажу від вихідного вірусу Sabin. Посівні серії вірусу готують у великих кількостях і зберігають при температурі нижче -60 °С.

Тільки робоча посівна серія вірусу, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для розмноження вірусу.

**Ідентифікація.** Даний тип поліовірусу, що міститься в кожній робочій посівній серії, ідентифікують із використанням специфічних антитіл.

**Концентрація вірусу.** Визначена зазначеним нижче методом концентрації вірусу є основою кількості вірусу, використовуваного при випробуванні нейровірулентності.

## Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна)

**Сторонні агенти (2.6.16).** Якщо робоча посівна серія вироблена в людських диплоїдних клітинах або в безперервних клітинних лініях, вона має витримувати вимоги щодо посівних серій вірусних вакцин. Якщо робоча посівна серія приготована в первинній культурі клітин нирок мавп, вона має витримувати вимоги, наведені в розділах «Розмноження і збір вірусу» та «Моновалентний об'єднаний збір», і випробування на статевозрілих і новонароджених мишах і мурчаках, наведені у статті (2.6.16).

Окрім вимог статті (2.6.16) для вакцин, вироблених у клітинних лініях і посівних серіях, одержаних із первинних клітинних культур нирок мавп, проводять валідоване випробування на sCMV.

Робоча посівна серія має бути вільною від послідовностей ДНК вірусу 40 мавп (SV40), що виявляються.

**Нейровірулентність.** Кожна головна і робоча посівні серії мають витримувати випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної) (2.6.19) на мавпах. Крім того, не менше 4 перших послідовних серій моновалентних об'єднаних зборів, приготованих із цієї посівної серії, мають витримувати випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної) (2.6.19) на мавпах, перш ніж дана посівна серія буде визнана придатною для використання. Більш того, посівна серія перестає бути придатною для виробництва вакцин, якщо частота неблагополучного виходу моновалентних об'єднаних зборів, приготованих із неї, перевищує статистично очікуваний рівень. Цей статистично очікуваний рівень розраховують після кожного випробування, виходячи з одержаних даних по всіх випробовуваних моновалентних об'єднаних зборах; він дорівнює ймовірності помилкового викиду в разі першого випробування (тобто 1 %), якщо ймовірність помилкового викиду повторного випробування незначна. Якщо випробування проводиться тільки виробником, компетентному уповноваженому органу слід надати для оцінки протоколи випробування.

**Генетичні маркери.** Кожну робочу посівну серію тестують на реплікативну здатність у області температур від 36 °C до 40 °C, як зазначено в розділі «Моновалентний об'єднаний збір». Складають профіль (тобто відсоток мутантів) вірусу посівної серії, використовуючи MAPREC-визначення. Посівні серії вірусу типу 3 мають витримувати вимоги MAPREC-визначення, як зазначено в розділі «Моновалентний об'єднаний збір».

### РОЗМНОЖЕННЯ І ЗБІР ВІРУСУ

Усі технологічні процеси з банком клітин і далі з культурою клітин проводять у асептичних умовах на ділянці, де під час виробництва не обробляються інші клітини або віруси. Середовище для культивування клітин може містити підхожу сироватку тварин

(але не сироватку людини), але кінцеве середовище для підтримки розмноження вірусу не має містити сироватку тварин. Сироватка та трипсин, використовувані для приготування клітинної суспензії та середовищ, мають бути вільні від сторонніх живих агентів. Середовище для культивування клітин може містити індикатор рН, такий як феноловий червоний, та підхожі антибіотики в найменшій ефективній концентрації. У виробництві бажано використовувати субстрати, вільні від антибіотиків. У день інокуляції вірусу в робочу посівну серію не менше 5 % або 1000 мл (що менше) культури клітин для виробництва вакцин відбирають як неінфіковану культуру клітин (контрольні клітини). Якщо у виробництві вакцин використовують культуру клітин нирок мавп, контрольні клітини мають витримувати спеціальні вимоги, наведені нижче. Суспензію вірусу збирають не пізніше 4 доби після інокуляції вірусу. Після інокуляції робочої посівної серії вірусу в культуру клітин для виробництва вакцини інокульовані клітини утримують в умовах підхожої постійної температури в межах 33–35 °C; відхилення температури не має перевищувати ( $\pm 0.5$ ) °C; культури контрольних клітин утримують при температурі 33–35 °C протягом відповідного періоду інкубації.

Тільки одиничний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування моновалентного об'єданого збору.

**Концентрація вірусу.** Концентрацію вірусу у вірусних зборах визначають, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», для контролю відтворюваності виробництва та визначення розведення для кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Молекулярні випробування відтворюваності виробництва.** MAPREC-визначення проводять на кожному вірусному зборі. Критерії прийнятності/відхилення відтворюваності виробництва визначаються для кожного виробника і для кожної робочої посівної серії та узгоджуються з компетентним уповноваженим органом. Ці критерії періодично переглядаються й оновлюються за вимогами компетентного уповноваженого органу. Проводяться дослідження з відтворюваності, якщо одержані результати з випробування вірусного збору відрізняються від попередніх в історії виробництва.

**Контрольні клітини.** Контрольні клітини виробничої культури клітин, з якої отриманий збір вірусу, мають витримувати вимоги щодо випробування ідентифікації і вимоги щодо сторонніх агентів (2.6.16) або, якщо використовують первинні культури клітин нирок мавп, випробування, наведені нижче.

**Первинні культури клітин нирок мавп.** Нижче наведені спеціальні вимоги, застосовні для розмноження і збору вірусу в первинних культурах клітин нирок мавп.

**Культури клітин.** У день інокуляції вірусу в робочу посівну серію кожену культуру клітин обстежують

на наявність дегенерації, викликаної інфекційним агентом. Якщо в ході дослідження виявляють наявність сторонніх агентів, не використовують всю дану групу клітинних культур.

У день інокуляції вірусу в робочу посівну серію пробу не менше 30 мл об'єднаної рідини, відібраної з клітинних культур нирок кожної окремої мавпи або приплоду не більше 10 недоношених мавп, ділять на 2 рівні порції. Одну порцію об'єднаної рідини тестують у культурі клітин нирок мавпи того самого виду, але не тієї тварини, яку використовують у виробництві вакцин. Другу порцію об'єднаної рідини, якщо необхідно, тестують у культурі клітин нирок мавп інших видів так, щоб тести на об'єднаних рідинах були проведені в культурі клітин не менше 1 виду, чутливого до SV40. Об'єднану рідину інокують у флакони цих клітинних культур так, щоб розведення рідини в живильному середовищі не перевищувало 1:4. Площа клітинної поверхні має бути не менше 3 см<sup>2</sup>/мл об'єднаної рідини. Не менше 1 флакона кожного типу культур клітин не інокують, залишаючи як контроль. Якщо у виробництві вакцин використовують мавп, чутливих до SV40, випробування на другий вид не вимагається. При розмноженні клітин допускається застосування сироватки тварин, якщо вона не містить антитіл до SV40, але в середовищі для утримання після інокуляції випробовуваного матеріалу не має бути сироватки, за винятком випадків, зазначених нижче.

Культури інкубують при температурі 35-37 °С і спостерігають за ними загалом протягом не менше 4 тижнів. У ході цього періоду спостереження і після не менше 2 тижнів інкубації з кожної із цих культур проводять не менше 1 пересівання в ті самі системи клітинних культур. За субкультурами також спостерігають протягом не менше 2 тижнів.

У вихідну культуру клітин на стадії пересівання може бути додана сироватка, тільки якщо вона не містить антитіл до SV40.

Можна застосовувати методики з використанням флуоресцентних антитіл для виявлення в клітинах SV40 і інших вірусів.

Далі тестують зразок не менше 10 мл об'єднаної рідини на відсутність вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В) і інших вірусів інокуляцією в культуру клітин нирок кролика. Сироватка, використана в живильному середовищі цих культур, не має містити інгібітори вірусу В. Як індикатор відсутності інгібіторів вірусу В використовують вірус герпесу людини з урахуванням небезпеки перенесення вірусу герпесу 1 *cercopithecine* (вірус В). Пробу інокують у флакони цих клітинних культур так, щоб розведення в живильному середовищі не перевищувало 1:4. Площа клітинної поверхні має бути не менше 3 см<sup>2</sup>/мл об'єднаної рідини. Не менше 1 флакона кожного типу культур клітин не інокують, залишаючи як контроль.

Культури інкубують при температурі 35-37 °С і спостерігають протягом не менше 2 тижнів.

Ще один зразок не менше 10 мл об'єднаної рідини, відібраний з культури клітин у день інокуляції посівної серії вірусу, тестують на наявність сторонніх агентів інокуляцією в культуру клітин людини, чутливих до вірусу кору.

Результати випробування вважають невірогідними, якщо більше 20 % флаконів культур забраковані з неспецифічних, випадкових причин у кінці відповідного періоду випробувань.

Якщо в цих випробуваннях виявляють докази наявності сторонніх агентів, одиничний збір зі всієї даної групи культур клітин бракують.

При виявленні вірусу герпесу типу 1 *cercopithecine* (вірус В) виробництво вакцини для профілактики поліомієліту (оральної) припиняють і інформують компетентний уповноважений орган. Виробництво не відновлюють, доки не завершені детальні дослідження, не вжито відповідних заходів із запобігання можливому інфікуванню і не отримано на це дозвіл компетентного уповноваженого органу.

Якщо ці випробування не проведені негайно, зразки об'єднаної рідини клітинних культур слід зберігати при температурі -60 °С або нижче, окрім зразка для випробування вірусу В, який зберігають при температурі 4 °С, і проводять випробування не пізніше 7 діб після відбору проби.

*Контрольні клітинні культури.* У день інокуляції робочою посівною серією вірусу 25 % (але не більше 2.5 л) клітинної суспензії, одержаної із нирок кожної мавпи або не більше 10 недоношених мавп, відбирають для приготування неінокульованої контрольної культури клітин. Ці контрольні культури клітин інкубують в аналогічних із інокульованою культурою умовах протягом не менше 2 тижнів і протягом усього періоду інкубації обстежують на предмет цитопатичних змін. Результати випробування вважають невірогідними, якщо більше 20 % контрольних культур клітин забраковані з неспецифічних, випадкових причин. У кінці періоду спостереження контрольні культури клітин обстежують на наявність дегенерації, викликаної інфекційним агентом. Якщо ці спостереження або якісь випробування, наведені в цьому розділі, виявляють наявність сторонніх агентів, поліовірус, вищезгаданий у відповідних інокульованих культурах даної групи, слід забракувати.

*Випробування на гемоадсорбуючі віруси.* Під час збору або протягом 4 діб після інокуляції виробничих культур робочою посівною серією вірусу відбирають пробу, що становить 4 % контрольних культур клітин, для тесту на гемоадсорбуючі віруси. У кінці періоду спостереження контрольні клітини, що залишилися, піддають аналогічним випробуванням. Випробування проводять, як зазначено в статті (2.6.16).

*Випробування на інші сторонні агенти.* Під час збору або протягом 7 діб після інокуляції виробничих культур робочою посівною серією вірусу відбирають не менше 20 мл об'єднаної рідини з кожної групи

## Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна)

контрольних клітин і тестують на 2 різних культурах клітин нирок мавп, як зазначено вище.

У кінці періоду спостереження з вихідних контрольних культур клітин відбирають такі самі проби, що і для об'єднаної рідини, і тестують у 2 видах культур клітин нирок мавп і паралельно в культурі клітин кролика, як зазначено в розділі «Культури клітин».

При виявленні вірусу герпесу типу 1 *cercopithecine* (вірус В) не слід використовувати виробничу культуру клітин і необхідно вжити запобіжних заходів щодо виробництва вакцини, наведених вище.

Рідини, зібрані з контрольних культур клітин під час збору вірусу і в кінці періоду спостереження, можуть об'єднуватися перед проведенням випробування на сторонні агенти. У кожній зазначеній системі культури клітин тестують зразок об'єднаної рідини в об'ємі 2 %.

### ОДИНИЧНІ ЗБОРИ

*Випробування на нейтралізовані одиничні збори в культурах клітин нирок мавп.* Зразок не менше 10 мл кожного збору нейтралізують типоспецифічною імуносироваткою проти вірусу поліомієліту, одержаною не від мавп. При приготуванні імуносироватки для цих цілей використовувати імунізуючі агенти слід отримати не на культурі клітин мавп.

Половину нейтралізованої суспензії (відповідну не менше 5 мл одиничного збору) тестують у культурах клітин нирок мавп, приготованих із того самого виду, але не з тварини, яку використовували при виробництві вакцини. Другу половину нейтралізованої суспензії, якщо необхідно, тестують у культурі клітин нирок мавп іншого виду так, щоб тести на нейтралізованій суспензії були проведені в культурі клітин як мінімум 1 виду, чутливого до SV40.

Нейтралізовані суспензії додають у флакони цих клітинних культур так, щоб розведення рідини в живильному середовищі не перевищувало 1:4. Площа клітинної поверхні має бути не менше 3 см<sup>2</sup>/мл нейтралізованої суспензії. Не менше 1 флакона кожного типу культур клітин не інокують, залишаючи як контроль, і утримують у живильному середовищі, що містить специфічну імуносироватку в тій самій концентрації, яка використовувалася для нейтралізації.

При розмноженні клітин допускається застосування сироватки тварин, лише якщо вони не містять антитіл до SV40. Але в середовищі для утримування після інокуляції випробовуваного матеріалу не має бути сироватки, окрім випадків, зазначених нижче.

Культури інкубують при температурі 35-37 °C і спостерігають загалом протягом не менше 4 тижнів. У ході цього періоду спостереження і після не менше 2 тижнів інкубації з кожної із цих культур проводять не менше 1 пересівання в ті самі системи культур

клітин. За субкультурами також спостерігають протягом не менше 2 тижнів.

У вихідну культуру клітин на стадії пересівання може бути додана сироватка, тільки якщо вона не містить антитіл до SV40.

Проводять додаткові випробування на сторонні агенти на інших зразках нейтралізованих одиничних зборів, інокуючи 10 мл у людські культури клітин, чутливих до вірусу кору. Це випробування також валідують для визначення sCMV.

Можна застосовувати методики з використанням флуоресцентних антитіл для виявлення SV40 й інших вірусів у клітинах.

Результати випробування вважають невірними, якщо більше 20 % флаконів культур забраковані з неспецифічних, випадкових причин у кінці відповідного періоду випробувань.

При виявленні будь-яких цитопатичних змін культур слід досліджувати причини цих змін; якщо вони з'являються внаслідок ненейтралізованого поліовірусу, випробування повторюють. Якщо виявляються докази наявності SV40 або інших сторонніх агентів, що приписуються до одиничного збору, даний збір слід відбракувати.

### МОНОВАЛЕНТНИЙ ОБ'ЄДНАНИЙ ЗБІР

Моновалентні об'єднані збори готують об'єднанням достатньої кількості одиничних зборів одного типу вірусу. Моновалентні об'єднані збори, одержані з безперервних клітинних ліній, можуть бути очищені. Кожен моновалентний об'єднаний збір фільтрують крізь фільтр, що затримує бактерії.

Тільки моновалентний об'єднаний збір, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Ідентифікація.** Ідентифікують зазначений тип поліовірусу, що міститься в кожному моновалентному об'єднаному зборі, використовуючи специфічні антитіла.

**Концентрація вірусу.** Концентрація вірусу, визначена зазначеним нижче методом, є основою для розрахунку розведень для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини, для кількості вірусу, використовуюваного у випробуваннях з нейровірулентності, встановлення і контролю відтворюваності виробництва.

**Генетичні маркери.** Валідоване MAPREC-визначення проводять для поліовірусу типу 3 (Sabin). У цих аналізах установлюють кількість мутацій у положенні 472 геному (472-C) і виражають як співвідношення до Міжнародного стандарту для MAPREC-визначення поліовірусу типу 3 (Sabin). Моновалентний об'єднаний збір поліовірусу типу 3 не витримує

випробування з MAPREC-визначення, якщо в ньому виявляють значно більше 472-С, ніж у відповідному Міжнародному стандарті для MAPREC-визначень.

MAPREC-визначення поліовірусу типу 3 (Sabin) проводять, використовуючи стандартну операційну процедуру, затверджену компетентним уповноваженим органом. За підходу вважається процедура (*Аналіз мутантів ПЛР і рестрикційно-ферментативним розщеплюванням (MAPREC) – Mutant analysis by PCR and Restriction enzyme cleavage (MAPREC)*), запропонована підрозділом якості та безпеки біологічних препаратів ВООЗ (Quality and safety of Biologicals (QSB), Geneva). Лабораторія має бути акредитована компетентним уповноваженим органом на проведення визначення. Виробник і компетентний уповноважений орган мають домовитися про процедуру і критерії щодо визначення, чи містить моновалентний об'єднаний збір значно більше 472-С, ніж Міжнародний стандарт.

Критерії прийнятності/відхилення відтворюваності виробництва визначаються для кожного виробника і для кожної робочої посівної серії і узгоджуються із компетентним уповноваженим органом. Ці критерії коригуються щоразу, коли виробляється і аналізується нова партія. Проводять дослідження щодо відтворюваності виробництва, якщо одержані результати з дослідження моновалентного об'єднаного вірусного збору відрізняються від попередніх в історії виробництва.

Оскільки MAPREC-визначення поліовірусу типу 3 (Sabin) є надійним прогнозом для нейровірулентності *in vivo*, то якщо фільтрований моновалентний об'єднаний збір поліовірусу типу 3 (Sabin) не витримує MAPREC-визначення, слід почати дослідження відтворюваності виробничих процесів. Це дослідження також включає розгляд придатності робочої посівної серії.

Моновалентні об'єднані збори поліовірусу типу 3 (Sabin), що витримують MAPREC-визначення, потім тестують на нейровірулентність *in vivo*.

Для поліовірусу типу 3 результати MAPREC-визначення і випробування нейровірулентності на мавпах (2.6.19) спільно використовують для оцінки впливу змін у виробничих процесах або коли починає виробництво новий виробник.

У ході валідації MAPREC-визначень для поліовірусу типів 1 і 2, для фільтрованих нерозфасованих суспензій цих вірусів тестують їх здатність до розмноження при температурі 36 °С і 40 °С. Співвідношення реплікаційної здатності вірусу в моновалентному об'єднаному зборі отримують у межах температур 36 °С і 40 °С, порівнюючи з посівною серією або стандартним препаратом для маркерних випробувань і з підходящими gct/40- і gct/40+ штамами поліовірусу того самого типу. Коливання температури інкубації при проведенні цього випробування має бути в межах ( $\pm 0.1$ ) °С. Моновалентний об'єднаний

збір витримує випробування, якщо титр вірусу в зборі й у відповідному стандартному матеріалі при температурі 36 °С як мінімум на 5.0 log більше титру, визначеного при температурі 40 °С. Якщо ріст при температурі 40 °С настільки малий, що не можна провести вірогідне порівняння, використовують температурні межі 39.0-39.5 °С, при яких зниження титру стандартного матеріалу має бути в області 3.0-5.0 log свого рівня при температурі 36 °С. Для кожного вірусного штаму при заданій температурі визначають прийнятний мінімум скорочення. Якщо одержані титри для 1 або більше стандартних вірусів не відповідають очікуваним значенням, випробування слід повторити.

**Нейровірулентність (2.6.19).** Кожен моновалентний об'єднаний збір має витримувати випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної) на мавпах. Якщо випробування проводиться лише виробником, компетентному уповноваженому органу слід подати для оцінки протоколи випробувань. Як підходу альтернативу випробуванню нейровірулентності вакцин типів 1, 2 і 3 на мавпах можна використовувати модель TgPVR21 трансгенних мишей, якщо лабораторія визнана компетентною проводити дане випробування і досвід випробувань, що проводяться, задовольняє компетентний уповноважений орган. Випробування проводять, використовуючи стандартну операційну процедуру, затверджену компетентним уповноваженим органом. За підходу вважається процедура (*Тест нейровірулентності вакцини для профілактики поліомієліту типів 1, 2 або 3 живої (оральної) на трансгенних мишах, сприйнятливих до поліовірусів – Neurovirulence test of type 1, 2 or 3 live poliomyelitis vaccines (oral) in transgenic mice susceptible to poliovirus*), запропонована підрозділом якості і безпеки біологічних препаратів ВООЗ (WHO Quality and safety of Biologicals (QSB), Geneva).

**Первинні культури клітин нирок мавп.** Нижче наведені спеціальні вимоги для моновалентного об'єднаного збору, одержаного з первинної культури клітин нирок мавп.

**Ретровіруси.** Моновалентний об'єднаний збір досліджують за допомогою визначення зворотньою транскриптазою. Не має виявлятися наявність ретровірусів.

**Випробування на кроликах.** Зразок моновалентного об'єднаного збору тестують на вірус герпесу типу 1 *cercopithecine* (вірус В) й інші віруси. Не менше 100 мл збору вводять не менше 10 здоровим кроликам з масою тіла кожного 1.5-2.5 кг. Кожен кролик має отримати не менше 10 мл і не більше 20 мл збору, з яких 1 мл внутрішньошкірно вводять у декілька ділянок, поки максимальний об'єм ін'єкції у кожній ділянці не складе 0.1 мл, а те, що залишилось, вводять підшкірно. За кроликами спостерігають протягом не менше 3 тижнів, фіксуючи загибель тварин або появу ознак захворювання.



Усіх кроликів, загиблих після перших 24 год випробування або таких, що виявляють ознаки хвороби, піддають аутопсії і детально досліджують видалений мозок і органи для встановлення причин смерті.

Результати випробування вважають невірними, якщо більше 20 % інокульованих кроликів виявляють ознаки інтеркурентних інфекцій у період спостереження. Моновалентний об'єднаний збір витримує випробування, якщо жоден з кроликів не виявляє ознак інфекції вірусу В або інших сторонніх агентів або будь-яких уражень, властивих нерозфасованій суспензії.

При виявленні вірусу В до виробництва вакцини вживають заходів, зазначених у розділі «Культури клітин».

*Випробування на мурчаках. Якщо первинні культури клітин нирок мавп одержані не від мавп, що утримуються в закритих колоніях, моновалентний об'єднаний збір має витримувати наведене нижче випробування. Не менше 5 мурчакам із масою тіла кожного 350–450 г внутрішньоочеребрально вводять по 0.1 мл моновалентного об'єданого збору (0.05 мл у кожную півкулю) і по 0.5 мл вводять внутрішньочеревно. Кожен робочий день протягом 6 тижнів визначають ректальну температуру кожної тварини. В кінці періоду спостереження проводять аутопсію кожної тварини.*

Крім того, не менше 5 мурчакам внутрішньочеревно вводять по 0.5 мл і спостерігають, як зазначено вище, протягом 2–3 тижнів. У кінці періоду спостереження, використовуючи кров і суспензії печінки або тканин селезінки з цих тварин, проводять пасаж не менше 5 мурчакам. Протягом 2–3 тижнів вимірюють ректальну температуру цих мурчаків. Аутопсією досліджують всіх тварин, які в перший день дослідження загинули або були приспані, оскільки виявляли ознаки захворювання, або протягом 3 подальших днів мали температуру вище 40.1 °С; гістологічними дослідженнями вивчають наявність інфекцій філовірусів; крім того, вводять суспензію печінки, або тканин селезінки, або крові внутрішньочеревно не менше 3 мурчакам. Якщо помічені будь-які ознаки наявності філовірусної інфекції у крові досліджуваних тварин, проводять підтвердуючі серологічні випробування. Моновалентний об'єднаний збір витримує випробування, якщо не менше 80 % мурчаків виживають до кінця періоду спостереження, залишаються здоровими і жодна тварина не виявляє ознак філовірусної інфекції.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють із одного або більше моновалентних об'єднаних зборів із задовільною якістю, що містять один або більше типів вірусів. Можуть бути додані підходящі ароматизатори та стабілізатори.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1) із використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги щодо термічної стабільності і вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Використовуючи специфічні антитіла, слід підтвердити, що вакцина містить поліовірус кожного типу, зазначеного на етикетці.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Відсутність бактерій та грибів.** Кінцева нерозфасована вакцина має витримувати випробування на стерильність (2.6.1).

**Термічна стабільність.** Не менше трьох флаконів вакцини кінцевої серії у сухому стані витримують при температурі (37±1) °С протягом 48 год. Проводять визначення концентрації вірусу, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», паралельно для підігрітої вакцини і для вакцини, яку зберігають при рекомендованій температурі зберігання. Одержана різниця між загальною концентрацією вірусу в підігрітій і не підігрітій вакцині не має бути більше як 0.5 log одиниць інфекційного вірусу (CCID<sub>50</sub>) на одну дозу для людини.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають титр інфекційного вірусу методом розведення, використовуючи не менше трьох окремих флаконів вакцини за наведеною нижче методикою. Один флакон відповідного стандартного препарату вірусу титрують у трьох повторах для валідації кожного визначення. Концентрацію вірусу в стандартному препараті перевіряють, використовуючи контрольну карту, і кожна лабораторія на основі архівних даних установлює титр. Якщо вакцина містить більш як один тип поліовірусу, кожен тип титрують окремо, використовуючи підходящу типоспецифічну імуносироватку (або переважно моноклональні антитіла) для нейтралізації кожного конкретного типу.

Розраховують концентрацію вірусу в кожному флаконі вакцини і для кожного повтору стандартного

препарату, а також відповідну усереднену концентрацію вакцини, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, наведені в статті 5.3).

Для тривалентної вакцини встановлені усереднені вірусні титри на одну дозу для людини мають бути:

- не менше  $6.0 \log$  інфекційних одиниць вірусу ( $CCID_{50}$ ) для типу 1;
- не менше  $5.0 \log$  інфекційних одиниць вірусу ( $CCID_{50}$ ) для типу 2;
- не менше  $5.5 \log$  інфекційних одиниць вірусу ( $CCID_{50}$ ) для типу 3.

Для моновалентної і дивалентної вакцин мінімальний вірусний титр визначає компетентний уповноважений орган.

**Метод.** Відповідну кількість лунок мікропланшета інокують відповідним об'ємом вибраного розведення вірусу, потім додають відповідний об'єм клітинної суспензії Her-2 (Cincinnati) лінії. Культури досліджують на 7-му і 9-ту добу.

Результати випробування вважають невірними, якщо:

- довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) установленної концентрації вірусу стандартного препарату для трьох повторів більше як на  $(\pm 0.3) \log CCID_{50}$ ;
- концентрація вірусу стандартного препарату відрізняється від заявленого рівня більше як на  $0.5 \log CCID_{50}$ . При використанні стандартного препарату підприємства встановлюють його відповідність із Фармакопейним біологічним стандартним препаратом і регулярно контролюють цю відповідність.

Випробування повторюють, якщо довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації вакцини більше як на  $(\pm 0.3) \log CCID_{50}$ ; об'єднують тільки результати вірогідних визначень звичайними статистичними методами (наприклад, 5.3) для розрахунку концентрації вірусу в зразку. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) усередненої вірусної концентрації має бути не більше як  $(\pm 0.3) \log CCID_{50}$ .

**БСП вакцини для профілактики поліомієліту (оральної)** придатний для застосування як стандартний препарат.

В обґрунтованих і дозволених випадках можна використовувати інші варіанти кількісного визначення, що може припускати застосування критеріїв вірогідності та придатності, відмінних від наведених вище. У будь-якому разі вакцина має витримувати вище наведене випробування при тестуванні.

## МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають:

- типи поліовірусів, що містяться у вакцині;
- мінімальну кількість вірусів кожного типу, що містяться в одній дозі для людини;
- клітинний субстрат, використаний для приготування вакцини;

— вакцину не можна застосовувати у вигляді ін'єкцій.

## ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПРАВЦЯ (АДСОРБОВАНА)

### Vaccinum tetani adsorbatum

#### TETANUS VACCINE (ADSORBED)

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Вакцина для профілактики правця (адсорбована) — препарат правцевого анатоксину, обробленого формальдегідом і адсорбованого на мінеральному носії. Анатоксин готують із токсину, отриманого при вирощуванні *Clostridium tetani*, подальшою обробкою формальдегідом.

#### ВИРОБНИЦТВО

#### ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**Специфічна токсичність.** Спосіб виробництва валідують для підтвердження того, що при тестуванні продукт витримуватиме наведене нижче випробування. Кожному з 5 здорових мурчаків масою 250–350 г, що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування, підшкірно вводять вакцину в дозі еквівалентній п'яти дозам для людини, зазначеній на етикетці. Вакцина не витримує випробування, якщо протягом 21 доби після ін'єкції хоча б одна тварина виявляє симптоми правця або гине від правця. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють ще раз; вакцина не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

#### НЕРОЗФАСОВАНИЙ ОЧИЩЕНИЙ АНАТОКСИН

Для виробництва правцевого токсину, з якого отримують анатоксин, використовують посівні культури, засновані на певних системах посівних серій, зберігаючи здатність культури утворювати токсин, і, якщо необхідно, проводять обережну повторну селекцію для відновлення токсигенності. Високо токсигенний штам *Clostridium tetani* з відомими походженням й історією вирощують у підходящому рідкому середовищі. У кінці культивування визначають чистоту кожної культури і видаляють забруднені

## Вакцина для профілактики правця (адсорбована)

культури. В асептичних умовах відокремлюють середовище для культивування, що містить токсин, від бактеріальної маси. Визначають вміст токсину (Lf на мілілітр) (2.7.27) для контролю відтворюваності виробництва. Одиничні збори можуть об'єднуватися для приготування нерозфасованого очищеного анатоксину. Токсин очищають для видалення речовин, здатних викликати небажані поствакцинальні реакції у людини. Очищений токсин знешкоджують формальдегідом, використовуючи метод, що дозволяє уникнути руйнування імуногенної активності анатоксину і реверсії анатоксину в токсин, особливо при нагріванні. Як альтернатива очищення анатоксину може проводитися після знешкодження формальдегідом.

Тільки нерозфасований очищений анатоксин, що витримує наведені нижче вимоги, може використовуватися для приготування кінцевої нерозфасованої вакцини.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять визначення на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

**Відсутність токсину та реверсії анатоксину.** Використовуючи той самий буферний розчин (без адсорбенту), який входить до складу кінцевої вакцини, готують розчин нерозфасованого очищеного анатоксину в тій самій концентрації, що і в кінцевій вакцині. Отриманий розчин ділять на дві рівні частини. Одну частину витримують при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , іншу – при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом 6 тижнів. Розчини тестують, як наведено нижче. Використовують 15 мурчаків масою 250–350 г кожний, що раніше не піддавалися дії матеріалів, які можуть вплинути на результат випробування. Підшкірно кожному із 5 мурчаків вводять по 5 мл розчину, інкубованого при температурі  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Іншим 5 мурчакам підшкірно вводять по 5 мл розчину, інкубованого при температурі  $37^\circ\text{C}$ . Тим 5 мурчакам, що залишилися, підшкірно вводять по 1 мл неінкубованого нерозфасованого очищеного анатоксину, що містить не менше 500 Lf. Нерозфасований очищений анатоксин витримує випробування, якщо протягом 21 доби після ін'єкції жодна тварина не виявляє симптомів правця або не гине від правця. Якщо більше однієї тварини гине з неспецифічних причин, випробування повторюють; анатоксин не витримує випробування, якщо при повторному випробуванні гине більше однієї тварини.

**Антигенна чистота (2.7.27).** Не менше 1000 Lf/мг білкового азоту.

### КІНЦЕВА НЕРОЗФАСОВАНА ВАКЦИНА

Кінцеву нерозфасовану вакцину виготовляють адсорбцією відповідної кількості нерозфасованого очищеного анатоксину на мінеральний носій, такий як алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію

фосфат. Одержана суміш практично ізотонічна з кров'ю. Можуть бути додані підходящі антимікробні консерванти. Деякі антимікробні консерванти, зокрема фенольного типу, що негативно впливають на антигенну активність, не мають використовуватися.

Тільки кінцева нерозфасована вакцина, що витримує наведені нижче випробування, може використовуватися для приготування кінцевої серії.

**Антимікробні консерванти.** Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше 85 % і не більше 115 % від установленого значення.

**Стерильність (2.6.1).** Проводять випробування на стерильність із використанням 10 мл для кожного середовища.

### КІНЦЕВА СЕРІЯ

Кінцеву нерозфасовану вакцину в асептичних умовах розфасовують у стерильні контейнери з контролем першого розкриття. Контейнери закупорюють так, щоб запобігти забрудненню.

Тільки кінцева серія, що витримує вимоги кожного випробування, наведеного в розділах «Ідентифікація», «Випробування» і «Кількісне визначення», може бути випущена для застосування. Якщо для кінцевої нерозфасованої вакцини проведені випробування на антимікробні консерванти та кількісне визначення і одержані задовільні результати, ці випробування можна пропустити для кінцевої серії.

Якщо для нерозфасованого очищеного анатоксину або кінцевої нерозфасованої вакцини проводилося випробування на вільний формальдегід і було показано, що його вміст у кінцевій серії не перевищує 0.2 г/л, це випробування для кінцевої серії можна пропустити.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Правцевий анатоксин ідентифікують підходящим імунохімічним методом (2.7.1). Нижче як приклад наведений метод, застосовний для певних вакцин. У випробовуваній вакцині розчиняють необхідну кількість *натрію цитрату Р* для отримання розчину 100 г/л. Одержаний розчин витримують при температурі  $37^\circ\text{C}$  близько 16 год і центрифугують до отримання прозорої надосадової рідини. Прозора надосадова рідина має вступати у взаємодію з відповідною протиправцевою сироваткою, утворюючи преципітат.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Алюміній (2.5.13).** Не більше 1.25 мг на одну дозу для людини, якщо як адсорбент використовують алюмінію гідроксид або гідратований алюмінію фосфат.

**Вакцина для профілактики правця (адсорбована)**

Вільний формальдегід (2.4.18). Не більше 0.2 г/л.

Антимікробні консерванти. Де застосовно, визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.

Стерильність (2.6.1). Вакцина має витримувати випробування на стерильність.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Кількісне визначення проводять одним із методів випробування вакцини для профілактики правця (адсорбованої) (2.7.8).

Нижня межа довірчого інтервалу ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 40 МО на одну дозу для людини.

**МАРКУВАННЯ**

На етикетці зазначають:

- мінімальну кількість Міжнародних одиниць на одну дозу для людини;
- назву та кількість адсорбенту;
- вакцину слід струшувати перед застосуванням;
- вакцина не має бути заморожена.



**МОНОГРАФІЇ  
НА ІМУНОСИРОВАТКИ  
ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ  
ЛЮДИНОЮ**



## ІМУНОСИРОВАТКА ПРОТИ ОТРУТИ ГАДЮКИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

Immunoserum contra venena  
viperae europaeae

*VIPER VENOM ANTISERUM, EUROPEAN*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Імуносироватка проти отрути гадюки європейської, – препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні нейтралізувати отруту одного або більше видів гадюк. Глобуліни одержують фракціонуванням сироватки тварин, імунізованих проти отрути або отрут.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Нейтралізує отруту *Vipera ammodytes* або *Vipera aspis*, або *Vipera berus*, або *Vipera ursini*, або суміші цих отрут, зазначені на етикетці, знешкоджуючи їх для сприйнятливих до них тварин.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кожний мілілітр випробовуваного препарату має містити достатню кількість сироваткових глобулінів для нейтралізації не менше 100 LD<sub>50</sub> для мишей отрути *Vipera ammodytes* або *Vipera aspis* і не менше 50 LD<sub>50</sub> для мишей отрут інших видів гадюк.

Активність імуносироватки проти отрути гадюки європейської визначають встановленням дози, необхідної для захисту мишей від летального ефекту, викликаного фіксованою дозою отрути відповідного виду гадюк.

**Вибір тест-отрути.** Використовують отрути з окремих видів гадюк, що мають нормальні фізико-хімічні, токсикологічні й імунологічні характеристики. Переважні ліофілізовані отрути, що зберігають у темному місці при температурі (5±3) °С.

Вибирають отруту як тест-отруту, визначаючи LD<sub>50</sub> для мишей. За мишами спостерігають протягом 48 год.

**Визначення тест-дози отрути.** Готують послідовні розведення отрути, розчиненої у розчині 9 г/л натрію хлориду Рабо іншого ізотонічного розчинника, так, щоб середнє розведення в 0.25 мл містило очікувану дозу LD<sub>50</sub>. Одержані розведення розбавляють рівним об'ємом використаного розчинника. Для кожного розведення використовують не менше чотирьох мишей із масою тіла кожної від 18 г до 20 г.

Кожній миші внутрішньовенно вводять по 0.5 мл відповідного розведення. За мишами спостерігають протягом 48 год і реєструють кількість загибелей. Розраховують LD<sub>50</sub>, використовуючи звичайні статистичні методи.

**Визначення активності випробовуваної імуносироватки.** Розчинену тест-отруту розводять так, щоб 0.25 мл розчину містили 5 LD<sub>50</sub> тест-доз (розчин тест-отрути).

Готують серію розведень випробовуваної імуносироватки в розчині 9 г/л натрію хлориду Рабо іншого ізотонічного розчинника з фактором розведення від 1.5 до 2.5. Використовують достатню кількість і діапазон розведень, що гарантують отримання кривої смертності в межах від 20 % до 80 %, що дозволяє визначити статистичні варіації.

Готують суміші так, щоб 5 мл кожної суміші містили 2.5 мл одного розведення випробовуваної імуносироватки і 2.5 мл розчину тест-отрути. Суміш витримують при температурі 37 °С протягом 30 хв. Для кожної суміші використовують не менше шести мишей із масою тіла кожної від 18 г до 20 г. Кожній миші внутрішньовенно вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 48 год і реєструють кількість загибелей. Розраховують PD<sub>50</sub>, використовуючи звичайні статистичні методи. Одночасно перевіряють значення LD<sub>50</sub> в тест-дозі отрути, використовуючи наведену вище методику. Розраховують активність імуносироватки, використовуючи таку формулу:

$$\frac{(T_n - 1)}{PD_{50}}$$

де:

$T_n$  — значення LD<sub>50</sub> у тест-дозі отрути.

У кожній дозі суміші імуносироватки проти отрути для мишей у кінцевій точці міститься одна LD<sub>50</sub> отрути, яка залишається не нейтралізованою імуносироваткою і саме ця не нейтралізована отрута здатна викликати загибель 50 % мишей, інюльованих сумішшю. Отже, кількість отрути, нейтралізованої імуносироваткою на один LD<sub>50</sub> менше, ніж загальна кількість у кожній дозі для мишей. Тому, оскільки активність імуносироватки визначають за LD<sub>50</sub> в кожній дозі для мишей, формула розрахунку активності містить  $T_n - 1$ , а не  $T_n$ . Альтернативно можна розрахувати кількість тест-отрути, в міліграмах, яка нейтралізується 1 мл або іншим певним об'ємом випробовуваної імуносироватки.

### МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають отруту або отрути, проти яких ефективна імуносироватка.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:** слід вжити відповідних заходів безпеки для уникнення вдихання порошку змішаних отрут, оскільки вони виявляють алергенні властивості.



## СИРОВАТКА ПРОТИБОТУЛІНІЧНА

## Immunoserum botulinicum

## BOTULINUM ANTITOXIN

## ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протиботулінічна (ботуліновий антитоксин) – препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати токсини, утворені *Clostridium botulinum* типів А, В або Е або сумішшю токсинів цих типів.

## ВИРОБНИЦТВО

Одержують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти токсинів *Cl. botulinum* типів А, В і Е.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує токсини *Cl. botulinum* типів, зазначених на етикетці, знешкоджуючи їх для сприйнятливих до них тварин.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 500 МО протиботулінічної сироватки на мілілітр для кожного типу А і В і не менше 50 МО протиботулінічної сироватки на мілілітр – для типу Е.

Активність протиботулінічної сироватки визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мишей від летальних ефектів, викликаних фіксованою дозою ботулінового токсину, з кількістю стандартного препарату протиботулінічної сироватки, необхідної для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібні стандартні препарати кожного типу протиботулінічної сироватки, калібровані в Міжнародних одиницях (МО), і підходящий для використання як тест-токсин препарат ботулінових токсинів. Активність кожного тест-токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваної протиботулінічної сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протиботулінічної сироватки – це специфічна активність нейтралізації проти ботулінових токсинів типів А, В і Е, які містяться у зазначеній кількості міжнародних стандартів, що складаються з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Вибір випробовуваних тварин.* Використовують мишей; різниця в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

*Приготування тест-токсинів. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:* ботуліновий токсин особливо небезпечний – слід вжити виняткових заходів безпеки при роботі з ним. Токсини типів А, В і Е готують зі стерильних фільтратів близько 7-добових культур у рідкому середовищі *Cl. botulinum* типів А, В і Е. До фільтратів додають 2 об'єми гліцерину, концентрують, якщо необхідно, діалізуючи проти гліцерину, і зберігають при температурі дещо нижче 0 °С.

*Вибір тест-токсину.* Вибирають тест-токсин кожного типу, визначаючи для мишей L+/10 дозу і LD<sub>50</sub>; період спостереження – 96 год. Тест-токсини мають містити не менше 1000 LD<sub>50</sub> в L+/10 дозі.

*Визначення тест-доз токсинів (L+/10 доза).* У підходящій рідині готують розчини стандартних препаратів, що містять 0.25 МО протиботулінічної сироватки на мілілітр. Послідовно, використовуючи кожен розчин, визначають тест-дозу відповідного тест-токсину.

Готують суміші розчинів стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину стандартного препарату і один із розташованих послідовно об'ємів тест-токсину, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по чотири миші. Внутрішньочеревно кожній миші вводять по 1.0 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год.

Тест-доза токсину – це його мінімальна кількість в 1.0 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, здатна викликати загибель усіх чотирьох мишей у період спостереження.

*Визначення активності протиботулінічної сироватки.* Готують розчин кожного стандартного препарату в підходящій рідині, що містить 0.25 МО протиботулінічної сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину у підходящій рідині, що містить 2.5 тест-دوزи на мілілітр.

Використовуючи по черзі кожен розчин токсину і відповідного стандартного препарату, визначають активність протиботулінічної сироватки.

Готують суміші розчину тест-токсину й випробовуваної протиботулінічної сироватки: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваної протиботулінічної сироватки, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом 2.0 мл, який містить 0.5 МО, і до-

вводять загальний об'єм піджою рідиною до 5.0 мл. Одержану суміш витримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по чотири миші. Внутрішньочеревно кожній миші вводять по 1.0 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм протиботулінічної сироватки, який не здатний захистити мишей від загибелі, містить 0.5 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протиботулінічної сироватки в Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 2.0 мл або менше розчину стандартного препарату, гинуть, а миші, яким вводили більше, — виживають.

## СИРОВАТКА ПРОТИГАНГРЕНОЗНА (NOVYI)

### Immunoserum gangraenicum (Clostridium novyi)

#### GAS-GANGRENE ANTITOXIN (NOVYI)

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протигангренозна (гангренозний анти-токсин) (novyi) — препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати  $\alpha$ -токсин, утворений *Clostridium novyi* (колишня номенклатура — *Clostridium oedematiens*). Отримують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти *Cl. novyi*  $\alpha$ -токсину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує утворений *Cl. novyi*  $\alpha$ -токсин, знешкоджуючи його для сприйнятливих до нього тварин.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 3750 МО протигангренозної сироватки (novyi) на мілілітр.

Активність протигангренозної сироватки (novyi) визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мишей або інших підхожих тварин від летальних ефектів, викликаних фіксованою дозою *Cl. novyi* токсину, з кількістю стандартного препа-

рату протигангренозної сироватки (novyi), необхідної для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібен стандартний препарат протигангренозної сироватки (novyi), калібрований у Міжнародних одиницях (МО), і підхожий для використання як тест-токсин препарат *Cl. novyi* токсину. Активність тест-токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваної протигангренозної сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протигангренозної сироватки — це специфічна активність нейтралізації *Cl. novyi* токсину, яка міститься в зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату, що складається з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Вибір випробовуваних тварин.* При використанні мишей різниці в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

*Приготування тест-токсину.* Тест-токсин готують зі стерильного фільтрату культури *Cl. novyi*, яка культивувалася у рідкому середовищі близько 5 діб. Фільтрат обробляють амонію сульфатом Р, відбирають осад, що містить токсин, висушують у вакуумі над фосфору (V) оксидом Р, розтирають у порошок і зберігають у сухому вигляді.

*Вибір тест-токсину.* Вибирають тест-токсин, визначаючи для мишей L+ дозу і LD<sub>50</sub>; період спостереження — 72 год. L+ доза тест-токсину має бути 0.5 мг або менше, і кожна L+ доза має містити не менше 25 LD<sub>50</sub>.

*Визначення тест-дози токсину (L+ доза).* У підхожій рідині готують розчин стандартного препарату, що містить 12.5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

У підхожій рідині готують розчин тест-токсину, що містить в 1 мл точно відому кількість тест-токсину, таку як 10 мг.

Готують суміші розчину стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна суміш містить по 0.8 мл розчину стандартного препарату, один із розташованих послідовно об'ємів розчину тест-токсину, і доводять загальний об'єм піджою рідиною до 2.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньом'язово кожній миші вводять по 0.2 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 72 год.

Тест-доза токсину — це його мінімальна кількість у 0.2 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, здатна викликати загибель усіх шести мишей у період спостереження.

*Визначення активності протигангренозної сироватки.* Готують розчин стандартного препарату в підхожій

## Сироватка протигангренозна (*perfringens*)

рідині, що містить 12.5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину у підходящій рідині, що містить 12.5 тест-доз на мілілітр.

Готують суміші розчину тест-токсину та випробовуваної протигангренозної сироватки: кожна суміш містить по 0.8 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваної протигангренозної сироватки, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 2.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату: кожна суміш містить по 0.8 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом 0.8 мл, який містить 10 МО, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 2.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньом'язово кожній миші вводять по 0.2 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 72 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм протигангренозної сироватки, який не здатен захистити мишей від загибелі, містить 10 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протигангренозної сироватки у Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 0.8 мл або менше розчину стандартного препарату, гинуть, а ті останні, яким вводили суміші, що містять більше, — виживають.

## СИРОВАТКА ПРОТИГАНГРЕНОЗНА (PERFRINGENS)

Immunoserum gangraenicum  
(*Clostridium perfringens*)

### GAS-GANGRENE ANTITOXIN (PERFRINGENS)

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протигангренозна (гангренозний анти-токсин) (*perfringens*) — препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати  $\alpha$ -токсин, утворений *Clostridium perfringens*. Отримують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти *Cl. perfringens*  $\alpha$ -токсину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує утворений *Cl. perfringens*  $\alpha$ -токсин, знешкоджуючи його для сприйнятливих до нього тварин.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 1500 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

Активність протигангренозної сироватки (*perfringens*) визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мишей або інших підхожих тварин від летальних ефектів, викликаних фіксованою дозою *Cl. perfringens* токсину, з кількістю стандартного препарату протигангренозної сироватки (*perfringens*), необхідної для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібен стандартний препарат протигангренозної сироватки (*perfringens*), калібрований у Міжнародних одиницях (МО), і підходящий для використання як тест-токсин препарат *Cl. perfringens* токсину. Активність тест-токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваної протигангренозної сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протигангренозної сироватки — це специфічна активність нейтралізації *Cl. perfringens* токсину, яка міститься в зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату, що складається з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Вибір випробовуваних тварин.* При використанні мишей різниця в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

*Приготування тест-токсину.* Тест-токсин готують зі стерильного фільтрату культури *Cl. perfringens*, яка культивувалася в рідкому середовищі близько 5 діб. Фільтрат обробляють *амонію сульфатом Р*, відбирають осад, що містить токсин, висушують у вакуумі над *фосфору (V) оксидом Р*, розтирають у порошок і зберігають у сухому вигляді.

*Вибір тест-токсину.* Вибирають тест-токсин, визначаючи для мишей  $L+$  дозу і  $LD_{50}$ ; період спостереження — 48 год.  $L+$  доза тест-токсину має бути 4 мг або менше, і кожна  $L+$  доза має містити не менше 20  $LD_{50}$ .

*Визначення тест-дози токсину ( $L+$ доза).* У підходящій рідині готують розчин стандартного препарату, що містить 5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

У підходящій рідині готують розчин тест-токсину, що містить в 1 мл точно відому кількість тест-токсину, таку як 10 мг.

Готують суміші розчину стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину стандартного препарату, один із розташованих послідовно об'ємів розчину тест-токсину, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньовенно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 48 год.

Тест-доза токсину — це його мінімальна кількість у 0.5 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, здатна викликати загибель усіх шести мишей у період спостереження.

*Визначення активності протигангренозної сироватки.* Готують розчин стандартного препарату в підходящій рідині, що містить 5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину в підходящій рідині, що містить 5 тест-доз на мілілітр.

Готують суміші розчину тест-токсину та випробовуваної протигангренозної сироватки: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваної протигангренозної сироватки, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату; кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом 2.0 мл, який містить 10 МО, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньовенно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 48 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм протигангренозної сироватки, який не здатен захистити мишей від загибелі, містить 10 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протигангренозної сироватки у Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 2.0 мл або менше розчину стандартного препарату, гинуть, а ті останні, яким вводили суміші, що містять більше, — виживають.

## СИРОВАТКА ПРОТИГАНГРЕНОЗНА (SEPTICUM)

Immunoserum gangraenicum  
(Clostridium septicum)

*GAS-GANGRENE ANTITOXIN (SEPTICUM)*

### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протигангренозна (гангренозний анти-токсин) (septicum) — препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати  $\alpha$ -токсин, утворений *Clostridium septicum*. Отримують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти *Cl. septicum*  $\alpha$ -токсину.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує утворений *Cl. septicum*  $\alpha$ -токсин, знешкоджуючи його для сприйнятливих до нього тварин.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 1500 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

Активність протигангренозної сироватки (septicum) визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мишей або інших підхожих тварин від летальних ефектів, викликаних фіксованою дозою *Cl. septicum* токсину, з кількістю стандартного препарату протигангренозної сироватки (septicum), необхідної для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібен стандартний препарат протигангренозної сироватки (septicum), калібрований у Міжнародних одиницях (МО), і підходящий для використання як тест-токсин препарат *Cl. septicum* токсину. Активність тест-токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваної протигангренозної сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протигангренозної сироватки — це специфічна активність нейтралізації *Cl. septicum* токсину, яка міститься в зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату, що складається з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Вибір випробовуваних тварин.* При використанні мишей різниці в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

## Сироватка протигангренозна, змішана

**Приготування тест-токсину.** Тест-токсин готують зі стерильного фільтрату культури *Cl. septicum*, яка культивувалася в рідкому середовищі близько 5 діб. Фільтрат обробляють амонію сульфатом *P*, відбирають осад, що містить токсин, висушують у вакуумі над фосфору (1) оксидом *P*, розтирають у порошок і зберігають у сухому вигляді.

**Вибір тест-токсину.** Вибирають тест-токсин, визначаючи для мишей *L*+ дозу і  $LD_{50}$ ; період спостереження — 72 год. *L*+ доза тест-токсину має бути 0.5 мг або менше, і кожна *L*+ доза має містити не менше 25  $LD_{50}$ .

**Визначення тест-дозы токсину (*L*+ доза).** У підходячій рідині готують розчин стандартного препарату, що містить 5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

У підходячій рідині готують розчин тест-токсину, що містить в 1 мл точно відому кількість тест-токсину, таку як 20 мг.

Готують суміші розчину стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину стандартного препарату, один із розташованих послідовно об'ємів розчину тест-токсину, і доводять загальний об'єм підходячою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньовенно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 72 год.

Тест-доза токсину — це його мінімальна кількість у 0.5 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, здатна викликати загибель усіх шести мишей у період спостереження.

**Визначення активності протигангренозної сироватки.** Готують розчин стандартного препарату в підходячій рідині, що містить 5 МО протигангренозної сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину в підходячій рідині, що містить 5 тест-доз на мілілітр.

Готують суміші розчину тест-токсину та випробовуваної протигангренозної сироватки: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваної протигангренозної сироватки, і доводять загальний об'єм підходячою рідиною до 5.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату; кожна суміш містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом 2.0 мл, який містить 10 МО, і доводять загальний об'єм підходячою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі у захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Внутрішньовенно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 72 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм протигангренозної сироватки, який не здатен захистити мишей

від загибелі, містить 10 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протигангренозної сироватки у Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 2.0 мл або менше розчину стандартного препарату, гинуть, а ті останні, яким вводили суміші, що містять більше, — виживають.

## СІРОВАТКА ПРОТИГАНГРЕНОЗНА, ЗМІШАНА

### Immunoserum gangraenicum mixtum

#### GAS-GANGRENE ANTITOXIN (MIXED)

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протигангренозна, змішана (гангренозний антитоксин) готується змішуванням протигангренозної сироватки (повуї), протигангренозної сироватки (*perfringens*) і протигангренозної сироватки (*septicum*) у відповідних кількостях.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує  $\alpha$ -токсини, утворені *Clostridium novyi* (колишня номенклатура — *Clostridium oedematiens*), *Clostridium perfringens* і *Clostridium septicum*, знешкоджуючи їх для сприйнятливих до них тварин.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 1000 МО протигангренозної сироватки (повуї) на мілілітр; не менше 1000 МО протигангренозної сироватки (*perfringens*) на мілілітр; не менше 500 МО протигангренозної сироватки (*septicum*) на мілілітр.

Проводять кількісне визначення кожного компоненту, як зазначено у відповідних окремих статтях «Сироватка протигангренозна (повуї)», «Сироватка протигангренозна (*perfringens*)» і «Сироватка протигангренозна (*septicum*)».

## СИРОВАТКА ПРОТИДИФТЕРІЙНА

### Immunoserum diphthericum

#### *DIPHTERIA ANTITOXIN*

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протидифтерійна (дифтерійний анти-токсин) — препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати токсин, утворений *Corynebacterium diphtheriae*.

#### ВИРОБНИЦТВО

Одержують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти дифтерійного токсину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує токсин, утворений *C. diphtheriae*, знешкоджуючи його для сприйнятливих до нього тварин.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 1000 МО протидифтерійної сироватки на мілілітр, якщо вона одержана із сироватки коней, і не менше 500 МО протидифтерійної сироватки на мілілітр, якщо одержана з сироватки інших ссавців.

Активність протидифтерійної сироватки визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мурчаків або кроликів від еритрогенних ефектів, викликаних фіксованою дозою дифтерійного токсину, з кількістю стандартного препарату протидифтерійної сироватки, необхідної для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібен стандартний препарат протидифтерійної сироватки, калібрований у Міжнародних одиницях (МО), і підхожий для використання як тест-токсин препарат дифтерійного токсину. Активність тест-токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваної протидифтерійної сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протидифтерійної сироватки — це специфічна активність нейтралізації проти дифтерійного токсину, яка міститься в зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату, що складається з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Приготування тест-токсину.* Дифтерійний токсин готують із культури *C. diphtheriae*, отриманої у рідкому середовищі. Культуру фільтрують для отримання стерильного токсичного фільтрату і зберігають при температурі 4 °С.

*Вибір тест-токсину.* Для вибору токсину для використання як тест-токсин визначають Іг/100 дозу і мінімальну реактивну дозу для мурчаків або кроликів, спостерігаючи за тваринами протягом 48 год. Тест-токсин має містити не менше 200 мінімальних реактивних доз в Іг/100 дозі.

*Мінімальна реактивна доза.* Це найменша кількість токсину, яка при внутрішньошкірній ін'єкції мурчакам або кроликам протягом 48 год на місці ін'єкції викликає слабку типову реакцію.

Тест-токсин витримують протягом декількох місяців перед застосуванням у кількісному визначенні протидифтерійної сироватки. Протягом цього періоду токсичність зменшується, і можна збільшувати Іг/100 дозу. Через часті інтервали визначають мінімальну реактивну і Іг/100 дози. Після експериментального підтвердження стабільності Іг/100 дози тест-токсин вважається готовим до застосування і може використовуватися протягом тривалого періоду. Тест-токсин зберігають у захищеному від світла місці при температурі від 0 °С до 5 °С. Стерильність підтримують, додаючи толуол або інший антимікробний консервант, який не викликає швидкого зниження специфічної токсичності.

*Визначення тест-дози токсину (Іг/100 дози).* У підхожій рідині готують розчин стандартного препарату, що містить 0.1 МО протидифтерійної сироватки на мілілітр.

Готують суміші розчинів стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна містить по 1.0 мл розчину стандартного препарату, один із розташованих послідовно об'ємів розчину тест-токсину, і доводять загальний об'єм підхожою рідиною до 2.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом від 15 хв до 60 хв. Для кожної суміші використовують двох тварин. Кожній з них у депільований бік внутрішньошкірно вводять по 0.2 мл суміші. За тваринами спостерігають протягом 48 год.

Тест-доза токсину — це його мінімальна кількість у 0.2 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, що дає слабе, але характерне ураження в точці введення у вигляді еритеми.

*Визначення активності протидифтерійної сироватки.* Готують розчин стандартного препарату в підхожій рідині, що містить 0.125 МО протидифтерійної сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину в підхожій рідині, що містить 12.5 тест-доз на мілілітр.

Готують суміші розчину тест-токсину та випробовуваної протидифтерійної сироватки: кожна містить по 0.8 мл розчину тест-токсину, один із розташо-

## Сироватка протиправцева

ваних послідовно об'ємів випробовуваної протидифтерійної сироватки, і доводять загальний об'єм підхожою рідиною до 2.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату, що містять по 0.8 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом у 0.8 мл, який містить 0.1 МО, і доводять загальний об'єм підхожою рідиною до 2.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом від 15 хв до 60 хв. Для кожної суміші використовують двох тварин. Кожній з них у депільований бік внутрішньошкірно вводять по 0.2 мл суміші. За тваринами спостерігають протягом 48 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм протидифтерійної сироватки, який не здатний захистити мурчаків від еритематозних ефектів токсину, містить 0.1 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протидифтерійної сироватки у Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо на всіх ділянках ін'єкцій сумішей з 0.8 мл або менше розчину стандартного препарату спостерігаються еритематозні ураження, а на ділянках ін'єкцій сумішей, що містять більше, — ураження відсутні.

## СИРОВАТКА ПРОТИПРАВЦЕВА

### Immunoserum tetanicum ad usum humanum

#### TETANUS ANTITOXIN FOR HUMAN USE

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватка протиправцева (правцевий антитоксин) — препарат, що містить сироваткові глобуліни, здатні специфічно нейтралізувати токсин, утворений *Clostridium tetani*.

#### ВИРОБНИЦТВО

Одержують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти правцевого токсину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Специфічно нейтралізує утворений *Cl. tetani* токсин, знешкоджуючи його для сприйнятливих до нього тварин.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Не менше 1000 МО протиправцевої сироватки на мілілітр для профілактичного застосування і не менше 3000 МО протиправцевої сироватки на мілілітр для терапевтичного застосування.

Активність протиправцевої сироватки визначають шляхом порівняння дози, необхідної для захисту мурчаків або мишей від паралітичних ефектів, викликаних фіксованою дозою правцевого токсину, з кількістю стандартного препарату протиправцевої сироватки, необхідної для отримання такого самого захисту. В країнах, де метод паралічу не обов'язковий, можна використовувати метод летальних ефектів. Для цього методу кількість тварин і методика аналогічні описаному методу паралітичного ефекту, але кінцевою точкою вважають смерть тварин, а не параліч, і використовують  $L+10$  дозу замість  $Lp/10$  дози. Для цього порівняння потрібен стандартний препарат протиправцевої сироватки, калібрований у Міжнародних одиницях (МО), і підхожий для використання як тест-токсин препарат правцевого токсину. Активність тест-токсину визначають відносно стандартного препарату, активність випробовуваної протиправцевої сироватки визначають тим самим методом відносно активності тест-токсину.

Міжнародна одиниця протиправцевої сироватки — це специфічна активність нейтралізації правцевого токсину, яка міститься в зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату, що складається з певної кількості висушеної імуносироватки коня. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня Організація Охорони Здоров'я.

*Вибір випробовуваних тварин.* При використанні мишей різниці в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

*Приготування тест-токсину.* Тест-токсин готують зі стерильного фільтрату культури *Cl. tetani*, яка культивувалася в рідкому середовищі близько 9 діб. До фільтрату додають 1:2 об'єму гліцерину і зберігають при температурі дещо нижче 0 °С. Альтернативно фільтрат обробляють амонію сульфатом *P*, відбирають осад, що містить токсин, висушують у вакуумі над фосфору (*V*) оксидом *P*, розтирають у порошок і зберігають у сухому вигляді в запаяних ампулах або під вакуумом над фосфору (*V*) оксидом *P*.

*Визначення тест-дози токсину ( $Lp/10$  доза).* У підхожій рідині готують розчин стандартного препарату, що містить 0.5 МО протиправцевої сироватки на мілілітр.

Якщо тест-токсин зберігають у сухому вигляді, то його розчиняють у підхожій рідині.

Готують суміші розчинів стандартного препарату й розчину тест-токсину: кожна містить по 2.0 мл розчину стандартного препарату, один із розташованих послідовно об'ємів тест-токсину, і доводять загальний об'єм підхожою рідиною до 5.0 мл. Суміші ви-

тримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по шість мишей. Підшкірно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год. Паралізованих мишей присипляють.

Тест-доза токсину — це його мінімальна кількість у 0.5 мл суміші, частково нейтралізована стандартним препаратом, здатна викликати параліч у всіх шести мишей у період спостереження.

*Визначення активності протиправцевої сироватки.* Готують розчин стандартного препарату у підходящій рідині, що містить 0.5 МО протиправцевої сироватки на мілілітр.

Готують розчин тест-токсину в підходящій рідині, що містить 5 тест-доз на мілілітр.

Готують суміші розчинів тест-токсину і випробовуваної протиправцевої сироватки: кожна містить по 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваної протиправцевої сироватки, і доводять загальний об'єм підходящою

рідиною до 5.0 мл. Також готують суміші розчинів тест-токсину і розчину стандартного препарату, що містять 2.0 мл розчину тест-токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, центрованих за об'ємом 2.0 мл, що містить 1 МО, і доводять загальний об'єм підходящою рідиною до 5.0 мл. Суміші витримують при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Підшкірно кожній миші вводять по 0.5 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год. Паралізованих мишей присипляють.

Суміш, що містить найбільший об'єм протиправцевої сироватки, який не здатний захистити мишей від паралічу, містить 1 МО. Цю кількість використовують для розрахунку активності протиправцевої сироватки у Міжнародних одиницях на мілілітр.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 2.0 мл або менше розчину стандартного препарату, паралізовані, а ті, яким вводили суміші, що містять більше, — ні.





**МОНОГРАФІЇ  
НА ЛІКАРСЬКУ РОСЛИННУ  
СИРОВИНУ**



## АРНІКИ КВІТКИ

## Arnicae flos

## ARNICA FLOWER

Цілі або частково поламані, висушені квітучі кошики *Arnica montana* L.

**Вміст:** не менше 0.40 % м/м суми сесквітерпенових лактонів, у перерахунку на дигідрогеленаліну тиглат ( $C_{20}H_{26}O_5$ ; М.м. 346.42) і суху сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має ароматний запах.

Розкритий кошик досягає близько 20 мм у діаметрі та близько 15 мм у глибину, має ніжку від 2 см до 3 см завдовжки. Обгортка складається із від 18 до 24 видовжено-ланцетних приквітків із загостреними верхівками, розташованих у 1-2 ряди: приквітки близько від 8 мм до 10 мм завдовжки, зелені із жовтаво-зеленими зовнішніми волосками, що видімі під лупою. Ложе кошика близько 6 мм у діаметрі, опукле, стільникувате та вкрите волосками. Вздовж його периферії розташовані близько 20 несправжньоязичкових квіток від 20 мм до 30 мм завдовжки; диск ложа несе велику кількість трубчастих квіток близько 15 мм завдовжки. Зав'язь від 4 мм до 8 мм завдовжки, увінчана чубком із білуватих волосків від 4 мм до 8 мм завдовжки. Можуть бути наявними декілька коричневих сім'янок із чубком або без нього.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Обгортка складається із видовжено-овальних приквітків із загостреними верхівками та війчастим краєм. Несправжньоязичкова квітка має чашечку, редуовану на чубок із тонких, блискучих, білуватих, шорстких волосків. Оранжево-жовтий віночок має 7-10 паралельних жилок і закінчується 3 невеликими лопатями. Тичинки недорозвинені, із вільними пиляками. Вузька коричнева зав'язь несе приймочку, розділену на 2 лопаті, спрямовані назовні. Трубчаста квітка актиноморфна. Зав'язь і чашечка такі самі як і у несправжньоязичкових квіток. Короткий віночок має 5 відхилених трикутних лопатей; 5 фертильних тичинок зі склеєними пиляками.

**В.** Розділяють кошик на окремі частини. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин *хлоральгідрату Р*. Виявляються: епідерма приквітків обгортки із продиховими апаратами та волосками, більш численними на зовнішній (абаксіальній) поверхні. Трапляються декілька різних типів волосків: однорядні, багатоклітинні покривні волоски, до-

вжина яких варіює від 50 мкм до 500 мкм, особливо численні вони вздовж країв приквітків; ефіроолійні залозки із дворядно розташованими клітинами ніжки та голівки, близько 300 мкм завдовжки, численні на зовнішній поверхні приквітків; залозисті головчасті волоски із однорядною багатоклітинною ніжкою та багатоклітинною кулястою голівкою, близько 80 мкм завдовжки, численні на внутрішній поверхні приквітків. Епідерма віночків несправжньоязичкових квіток складається із сосочкоподібних або видовжених основних клітин, незначної кількості продихових апаратів і волосків різних типів: покривні волоски дуже загострені на кінцях, довжина їх може перевищувати 500 мкм, складаються вони із 1-3 проксимальних клітин із потовщеними оболонками та 2-4 дистальних клітин із тонкими оболонками; ефіроолійні залозки із дворядними багатоклітинними голівками; залозисті волоски із багатоклітинними ніжками та багатоклітинними кулястими голівками. На кінчиках язичків заокруглені сосочкоподібні

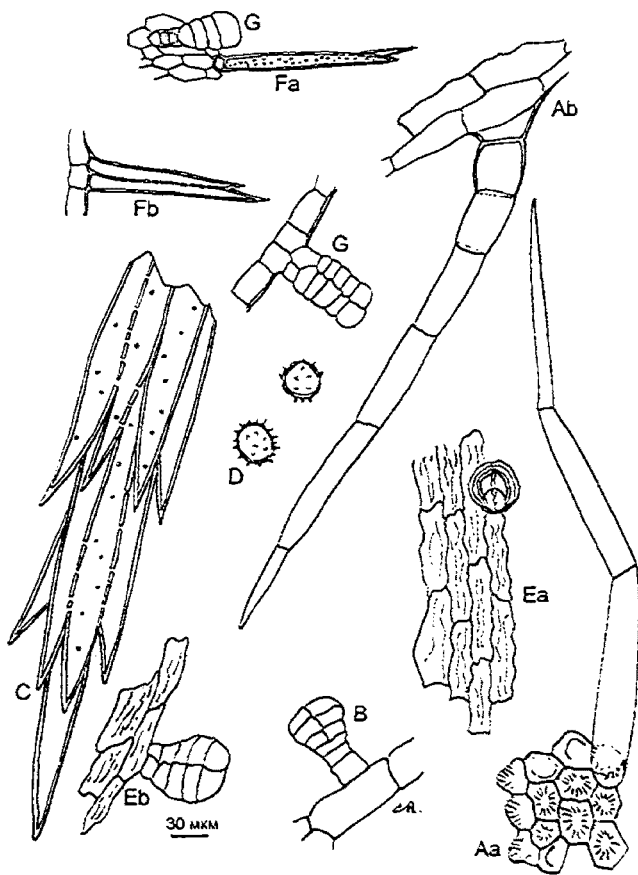


Рисунок 1391.-1. — *Діагностичні структури арніки квіток (Ідентифікація В)*

- Епідерма віночка несправжньоязичкової квітки із покривними волосками: вигляд із поверхні (Aa), вигляд збоку (Ab)
- Залозисті волоски із багатоклітинною голівкою
- Щетинки чашечки
- Пилкові зерна
- Епідерма віночка зі складчастою кутикулою та ефіроолійними залозками: вигляд із поверхні (Ea), вигляд збоку (Eb)
- Покривні волоски зав'язі: вигляд із поверхні (Fa), вигляд збоку (Fb)
- Залозисті волоски зав'язі

## Арніка квіткя

клітини. Епідерма зав'язі вкрита: ефіроолійними залозками із короткими ніжками та багатоклітинними кулястими голівками; здвоєними покривними волосками, що, звичайно, складаються із 2 подовжньо з'єднаних клітин із дрібно крапчастими оболонками; їх кінці гострі та, звичайно, роздвоєні. Епідерма чашечки складається із видовжених клітин, вкритих короткими, одноклітинними покривними волосками, що на верхівці закінчуються щетинкою. Пилкові зерна близько 30 мкм у діаметрі, округлі, із шипуватою екзиною та 3 проростковими порами.

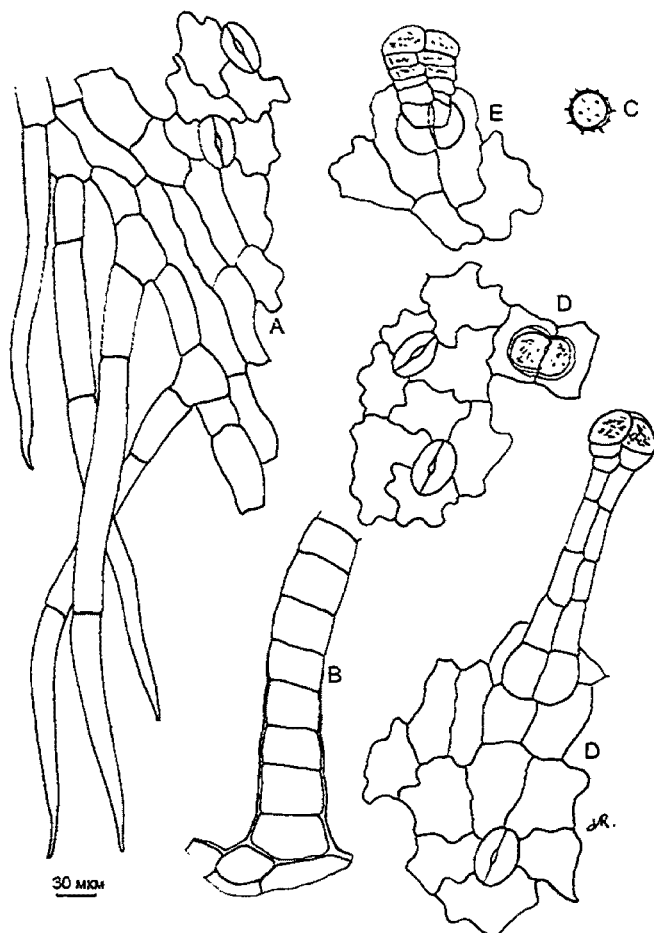


Рисунок 1391.-2. Діагностичні структури арніки квіток (Ідентифікація В)

- A. Епідерма приквітків обгортки із покривними волосками та продиховими апаратами
- B. Багатоклітинна ніжка покривного волоска
- C. Пилкові зерна
- D. Епідерма приквітків обгортки із продиховими апаратами та ефіроолійними залозками
- E. Ефіроолійна залозка

C. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні *Calendula officinalis* L. – *Heterotheca inuloides* Cass.

**Результати:** на хроматограмі випробованого розчину мають виявлятися: у середній частині - флуоресцююча блакитна зона, відповідна зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; над цією зоною - 3 флуоресцюючі жовтаво-коричневі або оранжево-жовті зони; над цими 3 зонами - зеленувато-жовта зона, відповідна астрагаліну; зона, розташована нижче зони астрагаліну, відпо-

відна ізокверцетрозиду; зона, розташована нижче цієї зони, відповідна лютеолін-7-глюкозиду. Також має виявлятися зеленувато-блакитна зона нижче зони кислоти кофейної на хроматограмі розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5.0 %.

*Calendula officinalis* L. – *Heterotheca inuloides* Cass. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 2.00 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р, нагрівають, струшуючи, у водяній бані при температурі 60 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 2.0 мг кислоти кофейної Р, 2.0 мг кислоти хлорогенової Р і 5.0 мг рутину Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 30 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - вода Р - метилетилкетон Р - етилацетат Р (10:10:30:50).

**Об'єм проби, що наноситься:** 15 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом кількох хвилин.

**Виявлення:** обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв, охолоджують на повітрі та переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині - оранжево-жовта флуоресцююча зона, відповідна рутину; у середній частині — флуоресцююча зона, відповідна кислоті хлорогеновій; у верхній частині — світло-блакитнувата флуоресцююча зона, відповідна кислоті кофейній. На хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися флуоресцююча оранжево-жовта зона, відповідна зоні рутину на хроматограмі розчину порівняння, не має виявлятися зона нижче цієї зони.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29)

Розчин внутрішнього стандарту. 0.010 г (точна наважка) ФСЗ сантоніну безпосередньо перед застосуванням розчиняють у 10.0 мл метанолу Р.

Випробуваний розчин. 1.00 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщують у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додають 50 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і води Р і нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі від 50 °С до 60 °С протягом 30 хв, часто струшуючи, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Паперовий фільтр, розрізаний на частини, додають до залишку у круглодонну колбу, додають 50 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і води Р і нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі від 50 °С до 60 °С протягом 30 хв, часто струшуючи. Повторюють цю процедуру двічі. До об'єднаного фільтрату додають 3.00 мл розчину внутрішнього стандарту та випарюють при зниженому тиску до об'єму 18 мл. Обполіскують круглодонну колбу водою Р і доводять об'єм змивами до 20.0 мл. Одержаний розчин переносять у хроматографічну колонку близько 0.15 м завдовжки та з внутрішнім діаметром близько 30 мм, що містить 15 г кізельгуру для хроматографії Р, і витримують протягом 20 хв. Елюють за допомогою 200 мл суміші рівних об'ємів етилацетату Р і метиленхлориду Р, одержаний елюат упарюють насухо у круглодонній колбі місткістю 250 мл, одержаний залишок розчиняють у 10.0 мл метанолу Р і додають 10.0 мл води Р, 7.0 г алюмінію оксиду нейтрального Р, струшують протягом 120 с, центрифугують при 5000 g протягом 10 хв і фільтрують крізь паперовий фільтр. 10.0 мл одержаного фільтрату упарюють насухо, одержаний залишок розчиняють у 3.0 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і води Р і фільтрують.

Колонка:

- розмір: 0.12 м × 4 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (4 мкм).

Рухома фаза:

- рухома фаза А: вода Р;
- рухома фаза В: метанол Р;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 3	62	38
3 - 20	62 → 55	38 → 45
20 - 30	55	45
30 - 55	55 → 45	45 → 55
55 - 57	45 → 0	55 → 100
57 - 70	0	100
70 - 90	62	38

Швидкість рухомої фази: 1.2 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 225 нм.

Об'єм інжекції: 20 мкл.

Вміст суми сесквітерпенових лактонів, у перерахунку на дигідрогеленаліну тиглат, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{S_{LS} \times C \times V \times 1.187 \times 100}{S_S \times m \times 1000}$$

де:

- $S_{LS}$  — площа піків сесквітерпенових лактонів, що виходять після піка сантоніну, на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $S_S$  — площа піка сантоніну на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $m$  — маса наважки сировини, у грамах;
- $C$  — концентрація сантоніну у розчині внутрішнього стандарту, що використовується для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах на мілілітр;
- $V$  — об'єм розчину внутрішнього стандарту, що використовується для приготування випробовуваного розчину;
- 1.187 — коефіцієнт перерахунку сантоніну на дигідрогеленаліну тиглат.

## АРНІКИ НАСТОЙКА

### Arnicae tinctura

#### ARNICA TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Арніки квітки».

Вміст: не менше 0.04 % суми сесквітерпенових лактонів, у перерахунку на дигідрогеленаліну тиглат ( $C_{20}H_{26}O_5$ ; М.м. 346.42).

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини та 10 частин спирту (від 60 % (об/об) до 70 % (об/об)) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Рідина жовтаво-коричневого кольору.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні *Calendula officinalis* — *Heterotheca inuloides*.

На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися:

- у середній частині блакитна флуоресцююча зона, відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння;

## Арніка настойка

- над цією зоною 3 флуоресціюючі зони від жовтаво-коричневого до оранжево-жовтого кольору, над цими 3 зонами зеленувато-жовта флуоресціююча зона астрагаліну; безпосередньо нижче зони астрагаліну зона ізокверцитрину; безпосередньо нижче цієї зони зона лютеолін-7-глюкозиду;
- флуоресціююча зеленувато-блакитна зона нижче зони кислоти кофейної на хроматограмі розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Calendula officinalis* — *Heterotheca inuloides*. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Випробовувана настойка.

*Розчин порівняння.* 2.0 мг кислоти кофейної Р, 2.0 мг кислоти хлорогенової Р і 5.0 мг рутину Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 30.0 мл.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10 мкм)).

*Рухома фаза:* кислота мурашина безводна Р — вода Р — метилетилкетон Р — етилацетат Р (10:10:30:50).

*Об'єм проби, що наноситься:* 30 мкл (або 8 мкл), смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см (або 8 см) від лінії старту.

*Висушування:* при температурі від 80 °С до 105 °С.

*Виявлення:* гарячу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв, висушують на повітрі та переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

*Результати:* на хроматограмі розчину порівняння у нижній частині має виявлятися оранжево-жовта флуоресціююча зона (рутин), у середній частині має виявлятися флуоресціююча зона кислоти хлорогенової; у верхній частині має виявлятися світло-блакитнувата флуоресціююча зона (кислота кофейна). На хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися флуоресціююча оранжево-жовта зона, відповідна рутину на хроматограмі розчину порівняння; не має виявлятися зона нижче зони рутину.

*Етанол (2.9.10).* Кінцева концентрація етанолу має бути не менше 90 % концентрації вихідного екстрагенту.

*Метанол і 2-пропанол (2.9.11).* Не більше 0.05 % (об/об) метанолу і не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

*Сухий залишок (2.8.16).* Не менше 1.7 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

*Рідинна хроматографія (2.2.29).*

*Розчин внутрішнього стандарту.* 0.010 г (точна наважка) ФСЗ сантоніну і 0.02 г бутил 4-гідроксибензоату Р розчиняють безпосередньо перед використанням у 10.0 мл метанолу Р.

*Випробуваний розчин.* 5.00 г настойки поміщають у круглодонну колбу, додають 2.00 мл розчину внутрішнього стандарту і 3 г алюмінію оксиду безводного Р, струшують протягом 120 с і фільтрують крізь паперовий фільтр. Круглодонну колбу та фільтр обполіскують 5 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і води Р і фільтрують. Одержаний фільтрат упарюють насухо, залишок розчиняють у 2.0 мл суміші вода Р — метанол Р (20:80) і фільтрують крізь мембранний фільтр (розмір пор 0.45 мкм).

*Розчин порівняння.* 0.02 г метил 4-гідроксибензоату Р і 0.02 г етил 4-гідроксибензоату Р розчиняють у метанолі Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 10.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.12 м × 4 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 20 °С.

*Рухома фаза:*

— рухома фаза А: вода Р;

— рухома фаза В: метанол Р;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 3	62	38
3 - 20	62 → 55	38 → 45
20 - 30	55	45
30 - 55	55 → 45	45 → 55

*Швидкість рухомої фази:* 1.2 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 225 нм.

*Об'єм інжекції:* 20 мкл.

*Відносний час утримування* до сантоніну (час утримування сантоніну — близько 9.5 хв): бутил 4-гідроксибензоату — близько 4.6.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 5 для піків метил 4-гідроксибензоату й етил 4-гідроксибензоату.

Вміст суми сесквітерпенових лактонів, у перерахунку на дигідрогеленаліну тиглат, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{F_1 \times C \times V \times 1,187}{F_2 \times m \times 10}$$

де:

$F_1$  — площа всіх піків, що виявляються між піками сантоніну та бутил 4-гідроксибензоату

- на хроматограмі випробовуваного розчину;
- F*<sub>2</sub> — площа піка сантоніну на хроматограмі випробовуваного розчину;
- m* — маса наважки настойки, у грамах;
- C* — концентрація сантоніну у розчині внутрішнього стандарту, взятого для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах на мілілітр;
- V* — об'єм розчину внутрішнього стандарту, взятого для приготування випробовуваного розчину, у мілілітрах;
- 1.187 — коефіцієнт перерахунку сантоніну на дигідрогеленаліну тиглат.

## АРТИШОКУ ЛИСТЯ

### *Synarae folium*

#### ARTICHOKE LEAF

Цілі або різані, висушені листки *Synara scolymus* L.

**Вміст:** не менше 0.8 % кислоти хлорогенової (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>; *M.m.* 354.3), у перерахунку на суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Цілий листок може досягати близько 70 см завдовжки і 30 см завширшки. Пластинка від глибоко лопатевої у верхній частині до близько (1-2) см із кожного боку черешка, у нижній частині листок перистий; усі сегменти із виразно зубчастими краями та звужені до верхівки. Колючки відсутні. Верхня поверхня пластинки зелена, із тонким покривом білуватих волосків, нижня поверхня блідо-зелена або біла та густо опушена довгими, переплутаними волосками. Черешок та основні жилки плоскі на верхній поверхні, на нижній поверхні вони рельєфно виступають та подовжньо борозенчасті, із помітними волосками на обох поверхнях.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (1000) (2.9.12). Порошок зеленувато-сірого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. В порошок виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1866.-1): фрагменти епідерми пластинки (вигляд із поверхні): верхня епідерма [F] складається із клітин із прямими або слабо звивистими оболонками [Fa], із прилеглою палисадною паренхімою [Fb]; клітини нижньої епідерми [C] із більш звивистими оболонками; численні продихові апарати аномоцитного типу (2.8.3) трапляються на обох поверхнях [D]; багатоклітинні, однорядні

покривні волоски у повстяних купках, більшість із них фрагментовані [Ca], із короткою ніжкою, що складається із декількох клітин, і дуже довгою, вузькою і часто закрученою кінцевою клітиною, інші волоски складаються із від 4 до 6 циліндричних клітин; дуже часто виявляються ефіроолійні залозки із короткою ніжкою та однорядною або дворядною голівкою (вигляд із поверхні) [E] або на поперечному зрізі [Ba]; численні фрагменти покривних волосків [G]; фрагменти пластинки на поперечному зрізі [B]; численні фрагменти судинної тканини черешка та жилок [A].

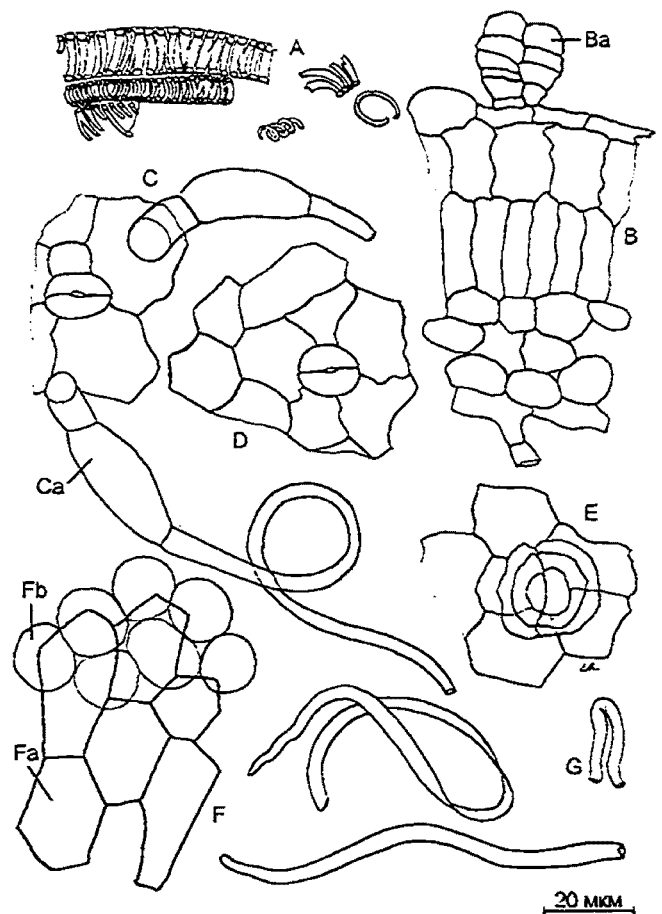


Рисунок 1866 -1. Діагностичні структури артишоку листків (Ідентифікація B)

#### C. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 2.0 г здрібненої на порошок сировини (1000) (2.9.12) додають 20 мл спирту (60 % об/об) *P*, витримують протягом 2 год, періодично перемішуючи, і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 5 мг лютеолін-7-глюкозиду *P* і 5 мг ФСЗ кислоти хлорогенової розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P* (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P* (2-10 мкм)).

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна *P* - кислота оцтова льодяна *P* - води *P* - етилацетат *P* (11:11:27:100).



## Артишоку листя

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл (або 2 мкл), смугами 10 мм (або 8 мм).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 13 см (або 6 см) від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: пластинку нагрівають при температурі 100 °С протягом 5 хв; теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти *P* у метанолі *P*, потім розчином 50 г/л марганцю 400 *P* у метанолі *P*, переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
	блакитна флуоресцююча зона
лютеолін -7- глюкозид: жовта або оранжева флуоресцююча зона	жовта або оранжева флуоресцююча зона (лютеолін -7- глюкозид)
хлорогенова кислота: блакитна флуоресцююча зона	блакитна флуоресцююча зона (хлорогенова кислота)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Загальна зола (2.4.16). Не більше 20.0 %.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин. До 0.500 г здрібненої на порошок сировини (1000) (2.9.12) додають 50.0 мл метанолу *P*, нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані при температурі 70 °С протягом 1 год, центрифугують і надосадову рідину переносять у мірну колбу місткістю 200 мл. Повторюють процедуру та доводять об'єм розчину у мірній колбі водою *P* до 200.0 мл.

Розчин порівняння. 5.0 мг ФСЗ кислоти хлорогенової *P* розчиняють у 50.0 мл метанолу *P*. 5.0 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу, додають 5 мл метанолу *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 20.0 мл.

Колонка:

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм);
- температура: 40 °С.

Рухома фаза:

- рухома фаза А: кислота фосфорна *P* - вода *P* (0.5:99.5);
- рухома фаза В: кислота фосфорна *P* - ацетонітрил *P* (0.5: 99.5);

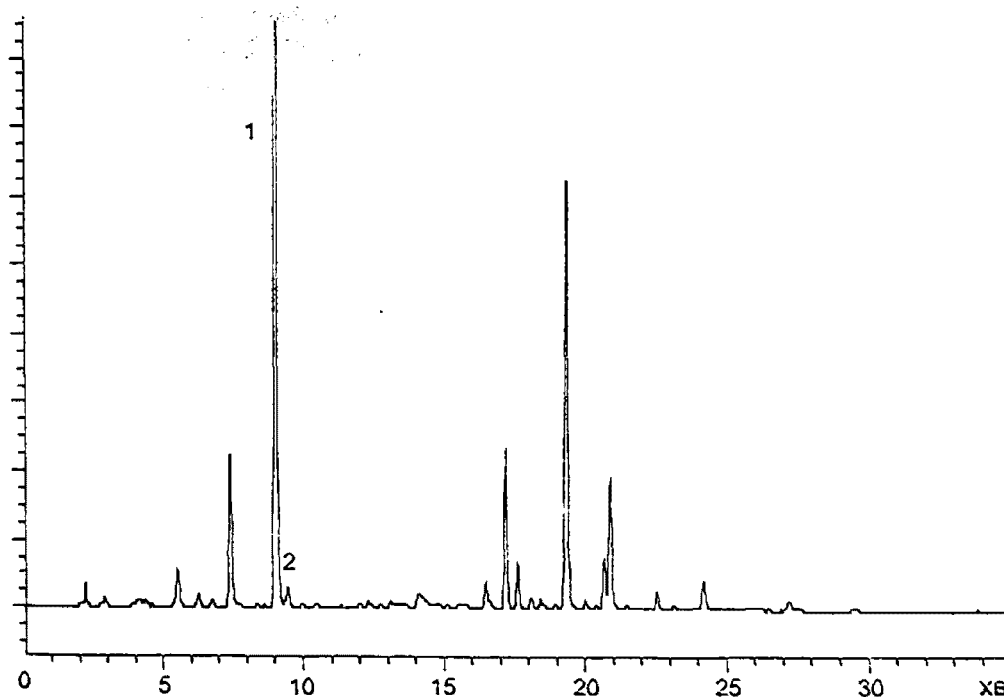


Рисунок 1866.-2. — Хроматограма, одержана при кількісному визначенні артишоку листя: випробовуваний розчин  
1, кислота хлорогенова 2, невідома речовина

Час (хв)	Рухомі фаза А (% об/об)	Рухомі фаза В (% об/об)
0 - 1	92	8
1 - 20	92 → 75	8 → 25
20 - 33	75	25
33 - 35	75 → 0	25 → 100

Швидкість рухомої фази: 1,2 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 330 нм.

Об'єм інжекції: 25 мкл.

Придатність хроматографічної системи: випробований розчин:

- одержана хроматограма має бути співставною із хроматограмою, наведеною на Рис. 1866.-2;
- коефіцієнт розділення: не менше 2 для піка кислоти хлорогенової та наступного піка (пік 2).

Вміст кислоти хлорогенової, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1}$$

де:

- $A_1$  — площа піка кислоти хлорогенової на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $A_2$  — площа піка кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння;
- $m_1$  — маса наважки сировини у випробовуваному розчині, у грамах;
- $m_2$  — маса ФСЗ кислоти хлорогенової у розчині порівняння, у грамах;
- $p$  — вміст кислоти хлорогенової у ФСЗ кислоти хлорогенової, у відсотках.

## БЕЛАДОННИ ЛИСТЯ НАСТОЙКА СТАНДАРТИЗОВАНА

### Belladonnae folii tinctura normata

#### BELLADONNA LEAF TINCTURE, STANDARDISED

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Беладонни листя».

Вміст: від 0,027 % до 0,033 % суми алкалоїдів, у перерахунку на гіосціамін ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ; *M.m.* 289,4). Алкалоїди представлені переважно гіосціаміном із невеликою кількістю гіосцину.

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку одержують із 1 частини здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) і 10 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 10,0 мл настойки упарюють насухо у водяній бані при температурі 40 °С при зниженому тиску. Залишок розчиняють в 1,0 мл метанолу Р.

Розчин порівняння. 1,0 мг кислоти хлорогенової Р і 2,5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухомі фази: кислота мурашина безводна Р - вода Р - метилетилкетон Р - етилацетат Р (10:10:30:50).

Об'єм проби, що наноситься: 40 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухомі фази: 15 см від лінії старту.

Висушування: при температурі від 100 °С до 105 °С.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р; висушують на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
кислота хлорогенова: світло-блакитна флуоресцююча зона	світло-блакитна флуоресцююча зона (кислота хлорогенова)
	жовта або жовтаво-коричнева флуоресцююча зона
рутин: жовтаво-коричнева флуоресцююча зона	блакитнувато-сіра флуоресцююча зона
	жовта флуоресцююча зона
	жовтаво-коричнева флуоресцююча зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

В. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні на атропін, виявлення А.

Результати А: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. Можуть виявлятися інші слабкі зони, зокрема у середній частині хроматограми, одержаної із 40 мкл випробовуваного розчину або близько лінії старту хроматограми, одержаної із 20 мкл випробовуваного розчину.

## Беладоння листя настойка стандартизована

Верхня частина пластинки	
гіосцин: коричнювато-оранжева зона	коричнювато-оранжева зона (гіосцин)
	слабі додаткові зони
гіосціамін: коричнювато-оранжева зона	коричнювато-оранжева зона (гіосціамін)
	слабі додаткові зони
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Атропін.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 15.0 мл настойки додають 15 мл 0.05 М розчину кислоти сірчаної та фільтрують. До одержаного фільтрату додають 1 мл розчину аміаку концентрованого Р і струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, ефіру, вільного від пероксидів, Р. Якщо необхідно, центрифугують. Об'єднані ефірні шари сушать над натрію сульфатом безводним Р, фільтрують і упарюють насухо на водяній бані. Одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл метанолу Р.

**Розчин порівняння.** 50 мг гіосціаміну сульфату Р розчиняють у 9 мл метанолу Р. 15 мг гіосцину гідроброміду Р розчиняють у 10 мл метанолу Р. Змішують 1.8 мл розчину гіосцину гідроброміду і 8 мл гіосціаміну сульфату.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** розчин аміаку концентрований Р - вода Р - ацетон Р (3:7:90).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл і 40 мкл кожного розчину, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв.

**Виявлення А:** обприскують розчином калію йодовісмутату Р2.

**Виявлення В:** обприскують розчином натрію нітриту Р доки пластинка не стане прозорою, переглядають через 15 хв.

**Результати В:** зони, відповідні гіосціаміну, на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння змінюють колір від коричнювато-оранжевого до червонувато-коричневого, але не сірувато-блакитного (атропін), інші додаткові зони зникають.

**Етанол (2.9.10).** Від 64 % (об/об) до 69 % (об/об).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

50.0 г настойки випарюють до об'єму близько 10 мл, за допомогою мінімального необхідного об'єму

спирту (70 % об/об) Р кількісно переносять у ділительну лійку, додають 5 мл розчину аміаку Р і 15 мл води Р, обережно, запобігаючи утворенню емульсії, струшують із 3 порціями, по 40 мл кожна, суміші метиленхлорид Р - ефір, вільний від пероксидів, Р (1:3), поки алкалоїди повністю не екстрагуються. Органічні шари об'єднують та концентрують методом відгону до об'єму 50 мл. Одержаний розчин кількісно переносять у ділительну лійку, ополіскуючи ефіром, вільним від пероксидів, Р, додають ефір, вільний від пероксидів, Р у кількості не менше 2.1 об'єму розчину, щоб одержати рідину із густиною менше густини води. Одержаний розчин струшують не менше як із 3 порціями, по 20 мл кожна, 0.25 М розчину кислоти сірчаної до повного екстрагування алкалоїдів. Якщо необхідно, відділяють шари центрифугуванням і переносять у ділительну лійку. Об'єднані шари підлучують розчином аміаку Р і струшують із не менше як 3 порціями, по 30 мл кожна, метиленхлориду Р, поки алкалоїди повністю не екстрагуються. Органічні шари об'єднують, додають 4 г натрію сульфату безводного Р і витримують протягом 30 хв, обережно струшуючи. Метиленхлорид декантують і фільтрують. Натрію сульфат промивають 3 порціями, по 10 мл кожна, метиленхлориду Р. Органічні витяги об'єднують, упарюють насухо на водяній бані, залишок нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. Залишок розчиняють у декількох мілілітрах метиленхлориду Р і знову упарюють насухо на водяній бані та нагрівають залишок при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. Одержаний залишок розчиняють у декількох мілілітрах метиленхлориду Р, додають 20.0 мл 0.01 М розчину кислоти сірчаної та видаляють метиленхлорид, випарюючи на водяній бані. Надлишок кислоти титрують 0.02 М розчином натрію гідроксиду, використовуючи як індикатор метилового червоного змішаний розчин Р.

Вміст суми алкалоїдів, у перерахунку на гіосціамін, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{57.88 \times (20 - n)}{100 \times m}$$

де:

*n* — об'єм 0.02 М розчину натрію гідроксиду, у мілілітрах,

*m* — маса наважки настойки, у грамах.

## БЕРЕЗИ ЛИСТЯ

## Betulae folium

## BIRCH LEAF

Цілі або фрагментовані, висушені листки *Betula pendula* Roth та/або *Betula pubescens* Ehrh., а також гібридів обох видів.

*Вміст:* не менше 1.5 % флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ; *М.м.* 464.4) і суху сировину.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Листки обох видів темно-зелені на адаксіальній поверхні та світло-зеленувато-сірі на абаксіальній поверхні; мають характерне густе сітчасте жилкування. Жилки світло-коричневого або майже білого кольору.

Листки *Betula pendula* голі, із густо розташованими залозками на обох поверхнях. Листки *Betula pendula* від 3 см до 7 см завдовжки та від 2 см до 5 см завширшки; черешки довгі; листкова пластинка із двічі зубчастим краєм, від трикутної до ромбічної форми, із ширококлиноподібною або усіченою основою. Кут кожного боку листкової пластинки не округлений або дещо округлений, її верхівка довга та загострена.

Листки *Betula pubescens* із нечисленними залозками та покривними волосками на обох поверхнях. На абаксіальній поверхні у кутах між жилками наявні невеликі пучки жовтаво-сірих волосків. Листки *Betula pubescens* дещо дрібніші, овальної або ромбічної форми, більш заокруглені. Вони шорсткі та більш правильно зубчасті. Верхівка не видовжена та не загострена.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок зеленувато-сірого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: численні фрагменти листкової пластинки із клітинами епідерми, що мають прямі оболонки, та клітинами нижньої епідерми, що оточують продихові апарати аномоцитного типу (2.8.3). Великі пельтатні залозки, звичайно, розміром від 100 мкм до 120 мкм, на верхній і нижній епідермах. Фрагменти мезофілу містять кристали кальцію оксалату. Фрагменти радіально розташованих судинних пучків і волокон склеренхіми, оточених кристалоносними обкладками. За наявності *Betula pubescens*, порошок також містить одноклітинні покривні волоски із дуже товстими оболонками, близько від 80 мкм до 600 мкм, звичайно 100-200 мкм завдовжки.

**C.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

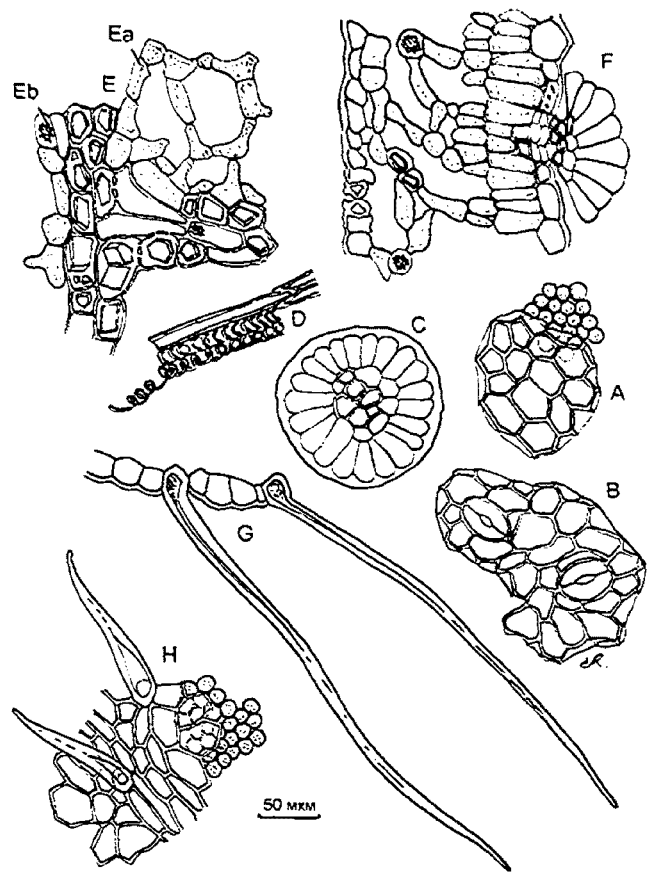


Рисунок 1174.-1. — *Діагностичні структури берези листків (Ідентифікація B)*

- A. Верхня епідерма пластинки із супровідною палисадною паренхімою
- B. Нижня епідерма пластинки із продиховими апаратами аномоцитного типу
- C. Пельтатна залозка (вигляд зверху)
- D. Судини із волокнами склеренхіми
- E. Кристалоносна обкладка із призмами кальцію оксалату, губчаста паренхіма (Ea) та клітини із друзою кальцію оксалату (Eb)
- F. Поперечний зріз пластинки, показано пельтатну залозку (вигляд збоку)
- G. Покривні волоски вздовж краю пластинки (*B. pubescens*)
- H. Покривні волоски верхньої епідерми пластинки (*B. pubescens*)

*Випробовуваний розчин.* До 1 г здрібненої на порошок (355) (2.9.12) сировини додають 10 мл метанолу Р, нагрівають у водяній бані при температурі 60 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 1 мг кислоти кофейної Р і 1 мг кислоти хлорогенової Р, 2.5 мг гіперозиду Р і 2.5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* кислота мурашина безводна Р - вода Р - метилетиловий ефір Р - етилацетат Р (10:10:30:50).

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* у струмені теплого повітря.

## Буркун

**Виявлення:** обприскують розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у метанолі *Р*; потім обприскують розчином 50 г/л *макрогалу 400 Р* у метанолі *Р*; сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння у нижній половині мають виявлятися три зони: у порядку зростання  $R_f$  зона жовтаво-коричневої флуоресценції (рутин), зона блакитної флуоресценції (кислота хлорогенова) і зона жовтаво-коричневої флуоресценції (гіперозид) і у верхній третині — зона блакитної флуоресценції (кислота кофейна).

На хроматограмі випробовуваного розчину на рівні зон, відповідних рутину, кислоти хлорогеновій і гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, мають виявлятися три зони, відповідні їм за флуоресценцією. Зона, відповідна рутину, має дуже слабу флуоресценцію, зона, відповідна гіперозиду, має інтенсивну флуоресценцію. На хроматограмі можуть виявлятися також інші зони слабої жовтаво-коричневої флуоресценції між зонами, що відповідають кислоті кофейній і кислоті хлорогеновій на хроматограмі розчину порівняння. Близько фронту розчинника виявляється зона червоної флуоресценції, відповідна хлорофілу. На хроматограмі випробовуваного розчину між цією зоною і зоною, відповідною кислоті кофейній на хроматограмі розчину порівняння, виявляється коричнювато-жовта зона, відповідна кверцетину.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 3 % фрагментів маточкових сережок і не більше 3 % інших сторонніх домішок.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок (355) сировини сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 5.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Вихідний розчин.** 0.200 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л *гексаметилентетраміну Р*, 20 мл *ацетону Р* і 2 мл *кислоти хлористоводневої Р1*, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв і фільтрують крізь тампон із вати у колбу місткістю 100 мл. Тампон із вати додають до залишку у круглодонну колбу та екстрагують 2 порціями, по 20 мл кожна, *ацетону Р*, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують до кімнатної температури, фільтрують кожний екстракт крізь тампон із вати у колбу. Одержані охолоджені об'єднані ацетонні екстракти фільтрують крізь паперовий фільтр

у мірну колбу, доводять об'єм розчину *ацетоном Р* до 100 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 20 мл *води Р* і екстрагують суміш із 15 мл, а потім із 3 порціями, по 10 мл кожна, *етилацетату Р*. Одержані етилацетатні витяги об'єднують у ділильній лійці, промивають 2 порціями, по 50 мл кожна, *води Р*, фільтрують над 10 г *натрію сульфату безводного Р* у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину *етилацетатом Р* до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл *реактиву алюмінію хлориду Р* та доводять розчином 5 % (об/об) *кислоти оцтової льодяної Р* у метанолі *Р* до об'єму 25.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (об/об) *кислоти оцтової льодяної Р* у метанолі *Р* до об'єму 25.0 мл.

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину через 30 хв у порівнянні із компенсаційним розчином за довжини хвилі 425 нм.

Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1.25}{m},$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм,

*m* — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання гіперозиду, що дорівнює 500.

## БУРКУН

### Meliloti herba

#### MELILOT

Цілі або різані, висушені надземні частини *Melilotus officinalis* (L.) Lam.

**Вміст:** не менше 0.3 % кумарину ( $C_9H_6O_2$ ; *М.л.* 146.1), у перерахунку на суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Стебло зелене, циліндричне, голе, тонко ребристе. Листки чергові, черешкові, трійчасті, із 2 ланцетними прилистками; листочки близько 3 см завдовжки, 20 мм завширшки, від видовжених до яйцеподібних, із дрібнозубчастим краєм, загостреною верхів-

кою та кланноподібною основою; верхня поверхня темно-зелена та гола, нижня поверхня блідо-зелена, вкрита короткими, тонкими волосками, особливо біля основи. Суцвіття — китиця із численних блідо-жовтих квіток, близько 7 мм завдовжки; квітка має опушену чашечку із 5 глибоко розділеними, нерівними зубцями та метеликовий віночок. Плід — нерозкривний біб, жовтаво-коричневий, короткий і загострений на верхівці, часто він знаходиться у неоппадаючій чашечці; поверхня боба гола та поперечно зморшкувата.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок жовтаво-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: фрагменти пластинки листка (вигляд із поверхні) із клітин епідерми із нерівномірно потовщеними, слабо звивистими оболонками та численних продигових апаратів, звичайно, аномоцитного типу із 3–6 побічними клітинами; однорядні покривні волоски із 2 коротких, базисних клітин із гладенькими оболонками та довгої термінальної клітини, зігнутої під прямим кутом, із товстою оболонкою та бородавчастою кутикулою; зрідка залозисті волоски із короткою, 2–3-клітинною ніжкою та яйцеподібною, дворядною голівкою із 4 нечітких клітин; окремі фрагменти пелюсток із сосочкоподібних клітин; фрагменти провідної тканини стебла із прилеглими, нездерев'янілими, септованими волокнами, що містять призми кальцію оксалату; фіброзний шар пиляка; пилкові зерна від кулястої до яйцеподібної форми, близько 25 мкм завдовжки, із 3 порами та гладенькою екзиною.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.3 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 3 мл метанолу Р, нагрівають на водяній бані при температурі 60 °С протягом 1 хв і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 50 мг ФСЗ кумарину та 20 мг кислоти о-кумарової Р розчиняють у 50 мл метанолу Р.

**Пластинка.** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** верхній шар суміші: кислота оцтова розведена Р - ефір Р - толуол Р (10:50:50).

**Об'єм проби, що наноситься:** 25 мкл, смугами по 10 мм.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 12 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують 2 М розчином калію гідроксиду спиртового. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші слабкі зони різного кольору.

Верхня частина пластинки	
кумарин: зеленувато-жовта флуоресціююча зона	зеленувато-жовта флуоресціююча зона (кумарин)
	синя флуоресціююча зона
о-кумарова кислота: зеленувато-жовта флуоресціююча зона	зеленувато-жовта флуоресціююча зона (о-кумарова кислота) може бути наявна
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 2 % стебел більше 3 мм у діаметрі; не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** Близько 50 г сировини повністю здрібнюють на порошок (500) (2.9.12). До 5.00 г здрібненої на порошок сировини додають 90 мл метанолу Р, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують під вакуумом крізь скляний фільтр. Одержаний залишок за допомогою 90 мл метанолу Р видаляють із фільтра та обробляють, як зазначено вище. Одержані фільтрати поєднують і доводять об'єм розчину метанолом Р до 250.0 мл.

**Розчин порівняння.** 25.0 мг ФСЗ кумарину розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 250.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4 мм,

— нерухома фаза: силікагель октадецилсильний ендкепований для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:** ацетонітрил Р - розчин 5 г/л кислоти фосфорної Р (22:78).

**Швидкість рухомої фази:** 1.7 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 275 нм.

**Об'єм інжекції:** 20 мкл.

## Буркуну трава

Придатність хроматографічної системи:

— час утримування: кумарину — близько 7.8 хв.

Вміст кумарину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1}$$

де:

$A_1$  — площа піка кумарину на хроматограмі випробовуваного розчину,

$A_2$  — площа піка кумарину на хроматограмі розчину порівняння,

$m_1$  — маса наважки сировини, у грамах,

$m_2$  — маса ФСЗ кумарину, взята для приготування розчину порівняння, у грамах.

N

## БУРКУНУ ТРАВА

Допускається використання цілих або різаних, висушених надземних частин *Melilotus officinalis* (L.) Pall. (синоніми *M. officinalis* (L.) Lam., *M. officinalis* (L.) Desr.) і *Melilotus altissimus* Thuill.

Зазначена сировина має витримувати наведені вище вимоги із такими змінами.

Вміст: не менше 0.6 % суми кумаринів, у перерахунку на кумарин ( $C_9H_6O_2$ ; М.м. 146.1) і суху сировину.

### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має характерний, приємний кумариновий запах і гіркуватий смак.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Стебло зелене, циліндричне, до 5 мм у діаметрі, порожнисте або заповнене м'якою, білуватою тканиною, голе, ребристе або тонко подовжно борозенчасте. Листки трійчасті, чергові, із черешком до 1.5 см завдовжки та 2 вузьколанцетними або шилоподібними, частіше цільними прилистками. Листочки цільні, близько від 2 см до 4 см завдовжки, від 10 мм до 20 мм завширшки, від видовженої до яйцеподібної або еліптичної форми, із перистим жилкуванням, дрібнозубчастим краєм, загостреною, тупуватою або виїмчастою верхівкою із маленьким гострим вістрям та клиноподібною основою; верхня поверхня листочків темно-зелена, гола, нижня — блідо-зелена, вкрита короткими, тонкими волосками, особливо біля основи та вздовж середньої жилки. Суцвіття — волоть, що складається із пазушних, пухких, однобічних китиць, від 5 см до 7(9) см завдовжки, із численних блідо-жовтих квіток, близько (5-7) мм завдовжки. Квітка має шовковисто опушену квітконіжку від 1 мм до 2 мм

завдовжки, зрослолисту, п'ятизубчасту чашечку, опушену дрібними волосками, та метеликовий віночок: у *M. officinalis* від 4.5 мм до 5 мм завдовжки, у *M. altissimus* від 5.5 мм до 7 мм завдовжки. Плід — одно- або двонасінний біб, від жовтавого до коричневого кольору, яйцеподібної форми, загострений на верхівці, часто він знаходиться у непадаючій чашечці. У *M. officinalis* біб (2.5-4) мм завдовжки, із голою, поперечно зморшкуватою поверхнею. У *M. altissimus* біб (4-6) мм завдовжки із притиснуто опушеною, сітчасто зморшкуватою поверхнею.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок жовтаво-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: фрагменти пластинки листка (вигляд із поверхні) із клітинами епідерми із нерівномірно потовщеними, дещо звивистими оболонками та численними продиховими апаратами, звичайно аноцитного або анізоцитного типів (2.8.3) із 3-6 побічними клітинами, одна із них часто дрібніша; однорядні покривні волоски до 300 мкм завдовжки, триклітинні, із них 2 нижні клітини короткі, із гладенькими оболонками, а термінальна клітина довга, зігнута під прямим кутом, із товстою оболонкою та бородавчастою кутикулою; зрідка залозисті волоски із короткою, 2-3-клітинною ніжкою та яйцеподібною або булавоподібною, дворядною голівкою із 4 нечітких клітин; крупні жилки оточені кристалоносною обкладкою із призмами кальцію оксалату; фрагменти паренхіми, окремі клітини якої містять друзи кальцію оксалату; фрагменти пелюсток із довгастих, дещо прямокутних клітин епідерми зі звивистими оболонками та тонкими спіральними судинами; фіброзний шар пиляка; пилкові зерна від кулястої до яйцеподібної форми, близько 25 мкм завдовжки, із 3 порами та гладенькою екзиною.

Сторонні домішки (2.8.2).

Додатково до зазначених вище сторонніх домішок допускається вміст таких сторонніх домішок:

— не більше 2 % поживтілих, побурілих частин трави.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 14.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Випробовуваний розчин. 1.0 г (точна наважка) здрібненої на порошок (500) (2.9.12) сировини поміщають у круглодонну колбу, додають 30 мл метанолу Р, 1 мл кислоти хлористоводневої Р1 і кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Суміш охолоджують до кімнатної температури, вміст колби фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 50 мл, запобігаючи потраплянню сировини на фільтр. До залишку у круглодонній колбі

додають 20 мл метанолу *P* і повторюють процедуру нагрівання протягом 30 хв. Після охолодження вміст фільтрують крізь той самий фільтр, у ту саму мірну колбу, доводять об'єм метанолу *P* до позначки та перемішують. 20.0 мл одержаного розчину переносять у ділильну лійку, додають 20 мл води *P*, перемішують та екстрагують три рази хлороформом *P* порціями: 1 — 20 мл, 2 та 3 — по 15 мл. Хлороформні витяги збирають у другу ділильну лійку, що містить 50 мл води *P*, обережно струшують протягом 1 хв, залишають до повного розділення шарів і відкидають водний шар. Промитий хлороформний шар фільтрують у мірну колбу місткістю 50 мл крізь фільтр, що містить 10 г натрію сульфату безводного *P*, фільтр промивають 5 мл хлороформу *P*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 5.0 мл одержаного розчину доводять хлороформом *P* до об'єму 50 мл.

*Розчин порівняння.* 0.015 г (точна наважка) ФСЗДФУ кумарину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл хлороформу *P*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 2.0 мл одержаного розчину доводять хлороформом *P* до об'єму 100 мл.

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі 275 нм відносно хлороформу *P*.

Вміст суми кумаринів, у перерахунку на кумарин, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{D_1 \times m_0 \times P \times 50}{D_0 \times m \times (100 - W)}$$

де:

$D_1$  — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 275 нм,

$D_0$  — оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 275 нм,

$m$  — маса наважки сировини, у грамах,

$m_0$  — маса наважки ФСЗДФУ кумарину, у грамах,

$P$  — вміст кумарину в ФСЗДФУ кумарину, у відсотках,

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

## ВЕРБЕНИ ТРАВА

### Verbenae herba

#### VERBENA HERB

Цілі або фрагментовані, висушені, зібрані під час цвітіння надземні частини *Verbena officinalis* L.

*Вміст:* не менше 1.5 % вербеналіну ( $C_{17}H_{24}O_{10}$ ; *M.m.* 388.4), у перерахунку на суху сировину.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Стебло сірувато-коричневого кольору, чотиригранне, подовжньо борозенчасте та шорстко опушене, особливо вздовж граней. Більші листки черешкові та глибоко перистолопатеві, із тупо зубчастими краями, менші листки сидячі, цільні, із городчастими або зубчастими краями; поверхні листків шорсткі та вкриті щетинистими волосками, особливо вздовж жилок, що виступають на нижній поверхні. Квітки численні, розташовані у пазухах листкоподібних приквітков, зібрані у прямостояче колосоподібне суцвіття; трубчаста чашечка має 5 загострених лопатей, віночок від блідо-рожевого до фіолетового кольору, майже вдвічі довший за чашечку.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок зеленувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошок виявляються: клітини епідерми стебла довгі, багатокутної або прямокутної форми, із потовщеними зовнішніми оболонками; фрагменти листків (вигляд із поверхні) із звивистостінних основних клітин епідерми та продигових апаратів аномоцитного або анізоцитного типів (2.8.3), більш численних у нижній епідермі; покривні волоски короткі, одноклітинні, товстостінні, близько 500 мкм завдовжки, широкі біля основи та піднімаються із центру окремої розетки куполоподібно кулястих клітин епідерми; зрідка залозисті головчасті волоски із багатоклітинною ніжкою та плоскою, від 4- до 8-клітинною голівкою, близько 25 мкм у діаметрі; ефіроолійні залозки із одноклітинною ніжкою та розширеною овальною, близько 65 мкм у діаметрі голівкою, що складається із 8 радіально розташованих клітин; фрагменти фіброзного шару пиляка із добре помітними потовщеннями; пилкові зерна трикутної або яйцеподібної, або округлої форми, близько 30 мкм у діаметрі, із 3 порами та гладенькою екзиною; окремі групи волокон, пористих судин та паренхімної тканини стебла.

**С.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні В на *Aloysia citrodora*.

*Результати:* нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
арбутин: синя або коричнева зона	коричнева або зелена зона
рутин: темно-коричнювато-жовта зона	інтенсивна коричнево-сіра зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин



**Вербени трава****ВИПРОБУВАННЯ***Aloysia citrodora*

**А.** Запах лимону вказує на наявність *Aloysia citrodora*.

**В.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.50 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 5 мл метанолу *P*, нагрівають у водяній бані при температурі 60 °С протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 10 мг арбутину *P* і 10 мл рутину *P* розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластика:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю (2-10 мкм)).

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна *P* - кислота оцтова льодяна *P* - вода *P* - етилацетат *P* (11:11:27:100).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл (або 5 мкл), смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 12 см (або 6 см) від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином анісового альдегіду *P* і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися інтенсивна синя або фіолетова зона практично на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння.

**Втрата в масі при висушуванні** (2.2.32). Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини

(710) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола** (2.4.16). Не більше 10.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті** (2.8.1). Не більше 2.0 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Розчин внутрішнього стандарту.** 10.0 мг кислоти ферулової *P* розчиняють у спирті (60 % об/об) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** До 1.00 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 50.0 мл розчину внутрішнього стандарту, перемішують за допомогою магнітної мішалки протягом 2 год, центрифугують протягом 15 хв і фільтрують надосадову рідину крізь мембранний фільтр із розміром пор 0.45 мкм.

**Розчин порівняння.** Вміст віали ФСЗ вербеналіну розчиняють у розчині внутрішнього стандарту та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5.0 мл.

**Передколонка:**

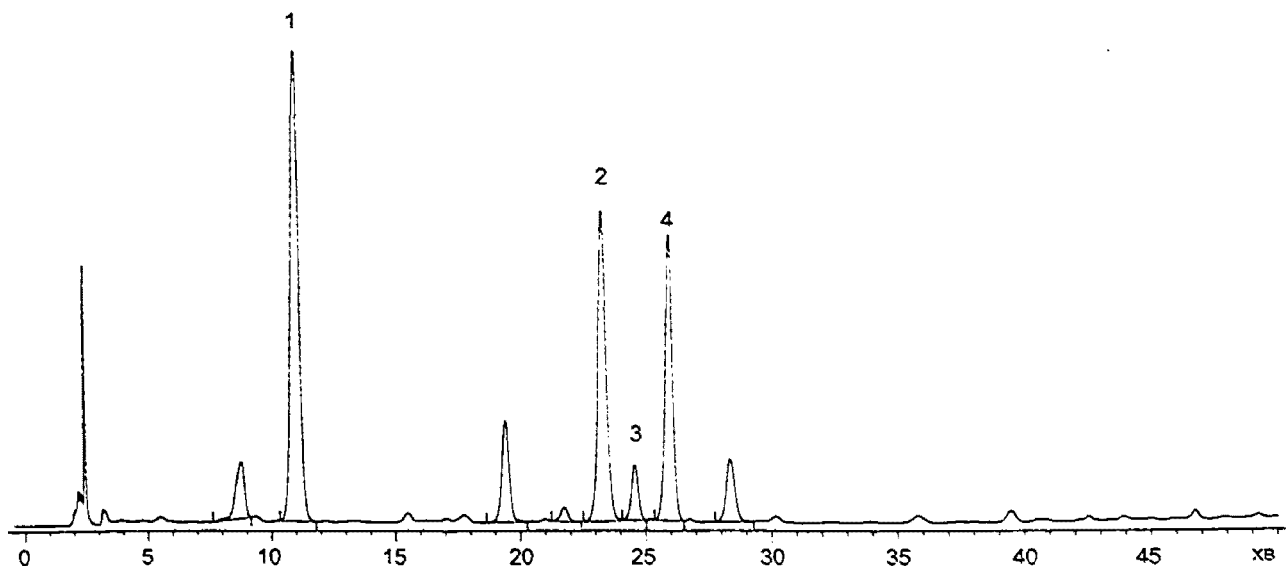
- розмір: 0.01 м × 4.0 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм).

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.0 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм);
- температура: 20 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: розчин 0.3 % (об/об) кислоти фосфорної *P*;



1. вербеналін    2. кислота ферулова    3. невідома речовина (може бути відсутньою)    4. актеозид

Рисунок 1854.-1. Хроматограма, одержана при кількісному визначенні вербени трави: випробовуваний розчин.

— рухома фаза В: ацетонітрил Р;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 20	93 → 83	7 → 17
20 - 30	83	17
30 - 35	83 → 75	17 → 25
35 - 40	75 → 20	25 → 80
40 - 45	20 → 93	80 → 7

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 240 нм.

Об'єм інжекції: 20 мкл.

Придатність хроматографічної системи: випробовуваний розчин:

- одержана хроматограма має співпадати із хроматограмою, наведеною на Рисунку 1854.-1;
- коефіцієнт розділення: не менше 3.5 для піків кислоти ферулової та актеозиду.

Вміст вербеналіну, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times A_4 \times m_2 \times 10}{A_2 \times A_3 \times m_1}$$

де:

- $A_1$  — площа піка вербеналіну на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $A_2$  — площа піка вербеналіну на хроматограмі розчину порівняння;
- $A_3$  — площа піка кислоти ферулової на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $A_4$  — площа піка кислоти ферулової на хроматограмі розчину порівняння;
- $m_1$  — маса наважки сировини, використаної для приготування випробовуваного розчину, у грамах;
- $m_2$  — маса вербеналіну у розчині порівняння, у грамах.

## ВІТЕКСА СВЯЩЕННОГО ПЛОДИ

### Agni casti fructus

#### AGNUS CASTUS FRUIT

Цілі, дозрілі, висушені плоди *Vitex agnus-castus* L.

Вміст: не менше 0.08 % кастіцину ( $C_{19}H_{18}O_8$ ; М.м. 374.3), у перерахунку на суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Плід вітекса священного (авраамового дерева) овальної або майже кулястої форми, близько 5 мм у

діаметрі. Чашечка, що не відпадає, зеленувато-сіра, густо опушена, закінчується 4-5 короткими зубчиками та прикриває від 2/3 до 3/4 поверхні плода. Плід чорнувато-коричневий, перикарпій його представлений склерифікованим ендокарпієм. Рубець від стовпчика часто помітний. Окремі плоди можуть мати плодоніжку, близько 1 мм завдовжки. На поперечному зрізі плода виявляються 4 гнізда, кожне із них містить довгасту насінину.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгидрату Р. У порошок виявляються: фрагменти зовнішньої епідерми чашечки із багатокутних клітин, густо вкритих короткими, зігнутими або звивистими, одно-, дво- або триклітинними однорядними покривними волосками; клітини екзокарпія із товстими оболонками і добре помітними, великими порами; окремі залозисті волоски із одноклітинною ніжкою та одно- або багатоклітинною голівкою; шари паренхіми із зовнішньої частини мезокарпія, деякі із них містять коричневий пігмент, інші досягають перегородки; фрагменти внутрішньої частини мезокарпія із тонкостінних, пористих, склерифікованих клітин і типових ізодіаметричних склерейд із дуже товстими, глибоко борозенчастими оболонками та вузькою, зірчастою порожниною; дрібні, коричневого кольору клітини ендокарпія; фрагменти насінної шкірки, що містять ділянки із досить крупних клітин із тонкими, здерев'янілими сітчасто потовщеними оболонками; численні фрагменти ендосперму із тонкостінних паренхімних клітин, які містять алейронові зерна та крапельки олії.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р, нагрівають у водяній бані при температурі 60 °С протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 0.5 мг аукубіну Р і 1 мг агнузиду Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1.0 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р (2-10 мкм)).

Рухома фаза: вода Р - метанол Р - етилацетат Р (8:15:77).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл (або 8 мкл), смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см (або 5 см) від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: пластинку обприскують кислотою мурашиною Р і нагрівають при температурі 120 °С протягом 10 хв; переглядають при денному світлі.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину

## Вітекса священного плоди

порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
агнузид: синя зона	синя зона (агнузид)
аукубін: синя зона	синя зона (аукубін)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Сторонні домішки (2.8.2). Не більше 3.0 %.

Інші види *Vitex*, зокрема *Vitex negundo*. Не має бути плодів інших видів, набагато більших у діаметрі.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 5.0 %.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 10 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) екстрагують 40 мл метанолу *P* протягом 2 хв, використовуючи, гомогенізатор із піджою швидкістю. Надосадову рідину збирають та фільтрують у колбу місткістю 250 мл.

Екстрагування повторюють, використовуючи ще 40 мл метанолу *P*, надосадову рідину так само збирають і фільтрують. Залишок обережно змивають невеликою кількістю метанолу *P*. Одержані метанольні фільтрати та змиви об'єднують, упарюють насухо у вакуумі у водяній бані при температурі не більше 30 °С. Залишок розчиняють у метанолі *P* за допомогою ультразвуку, доводять тим самим розчинником до 20.0 мл і фільтрують крізь мембранний фільтр (0.45 мкм). 1.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння. 100.0 мг ФСЗ вітекса священного плодів екстракту сухого стандартизованого розчиняють у 20.0 мл метанолу *P* за допомогою ультразвуку протягом 20 хв, потім доводять тим самим розчинником до об'єму 25.0 мл і фільтрують крізь мембранний фільтр (0.45 мкм).

Колонка:

- розмір: 0.125 м × 3.0 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (3 мкм),
- температура: 25 °С.

Рухома фаза:

- рухома фаза А: розчин 5.88 г/л кислоти фосфорної *P*;
- рухома фаза В: метанол *P*;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 13	50 → 35	50 → 65
13 - 18	35 → 0	65 → 100
18 - 23	0 → 50	100 → 50

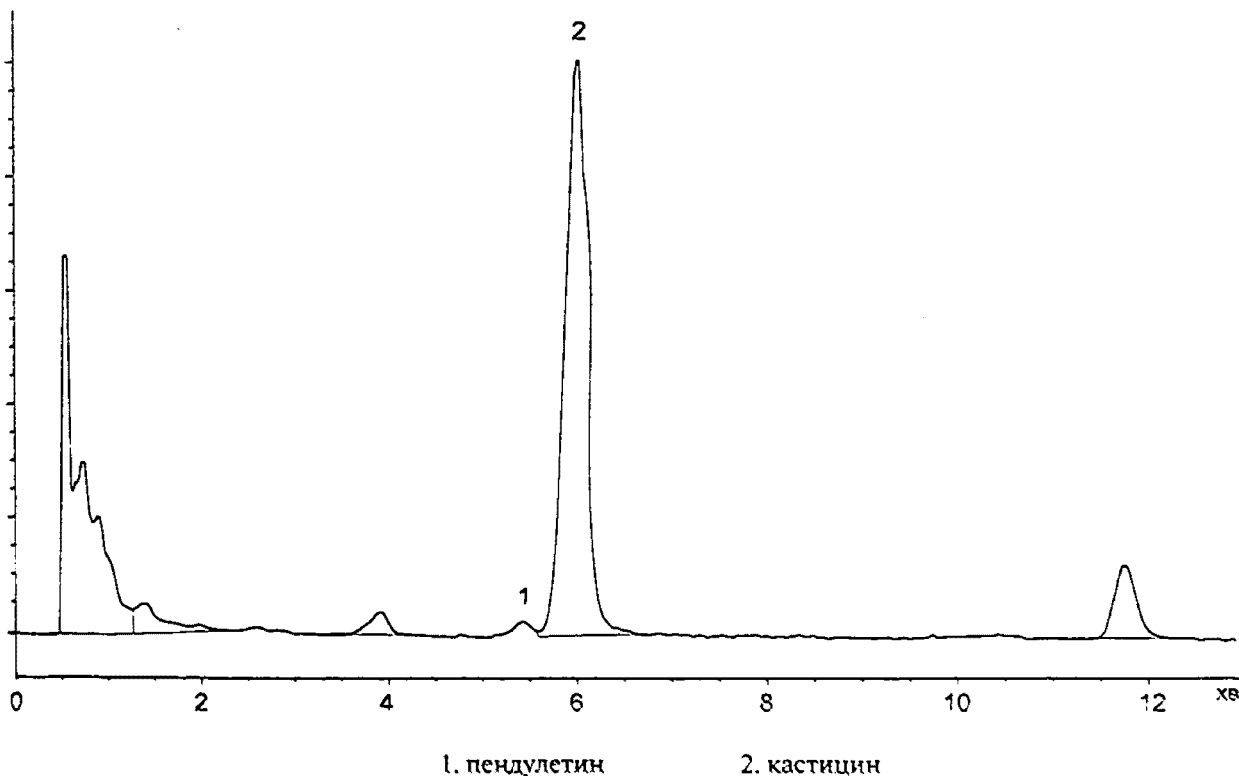


Рисунок 2147.-1.- Хроматограма, одержана при кількісному визначенні кастинину у вітекса священного плодах: випробовуваний розчин

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 348 нм.

Об'єм інжекції: 10 мкл.

Придатність хроматографічної системи: випробований розчин:

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків пендулетину та кастицину (див. Рисунок 2147.-1).

Вміст кастицину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1 \times 8}{F_2 \times m_1}$$

де:

$F_1$  — площа піка кастицину на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_2$  — площа піка кастицину на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса наважки сировини, використаної для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

$m_2$  — маса наважки ФСЗ вітекса священного плодів екстракту сухого стандартизованого, використаної для приготування розчину порівняння, у грамах;

$p_1$  — вміст кастицину у ФСЗ вітекса священного плодів екстракту сухого стандартизованого, у відсотках.

ньої жилки під гострим кутом, поступово вигинаються до країв пластинки, де від них відходять дрібні жилки, часто під прямим кутом.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок коричнево-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 0909.-1): фрагменти адаксіальної епідерми із клітин зі звивистими антиклінальними оболонками (вигляд із поверхні) [С, J], часто із дрібними, циліндричної форми клітинами палісадної паренхіми (вигляд із поверхні) [Ja] або видовженої форми (у поперечному зрізі) [F]; фрагменти абаксіальної епідерми із продиховими апаратами, переважно паразитного типу (2.8.3), (вигляд із поверхні) [В], які можуть бути із прилеглими, неправильної форми клітинами губчастого мезофілу [K, L]; зірчасті покривні волоски, щільні або поламані {A, D, M}, складаються із 4-12 одноклітинних волосків, з'єднаних біля основи, видовжених, конічних та зігнутих, звичайно близько 250 мкм завдовжки, товстостінних, із добре помітною порожниною, часто заповненою коричневим вмістом; волокна здерев'янілі та товстостінні, поодинокі або у групах, що супроводжуються обкладкою із призматичними кристалами кальцію оксалату [N, P]; склереїди, часто видовжені із одного або обох кінців, 150-180 мкм завдовжки, щільні або фрагментовані [H]; фрагменти кільчастих або спіральних судин [E]; ізольовані призми кальцію оксалату [G].

## ГАМАМЕЛІСУ ЛИСТЯ

### Hamamelidis folium

#### HAMAMELIS LEAF

Цілі або різані, висушені листки *Hamamelis virginiana* L.

Вміст: не менше 3% танінів, у перерахунку на пірогалол ( $C_6H_6O_3$ ; М.м. 126.1) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Листки зеленого або зеленувато-коричневого кольору, часто поламані, зморшкуваті та стиснені у більш-менш компактні грудочки. Пластинка від широкоовальної до обернено-яйцеподібної форми; основа її нерівнобока та асиметрична, верхівка загострена або, рідше, притуплена. Краї пластинки нерівногородчасті або зубчасті. Жилкування перисте, жилки виступають на нижній поверхні. Звичайно 4-6 пар жилок другого порядку відходять від серед-

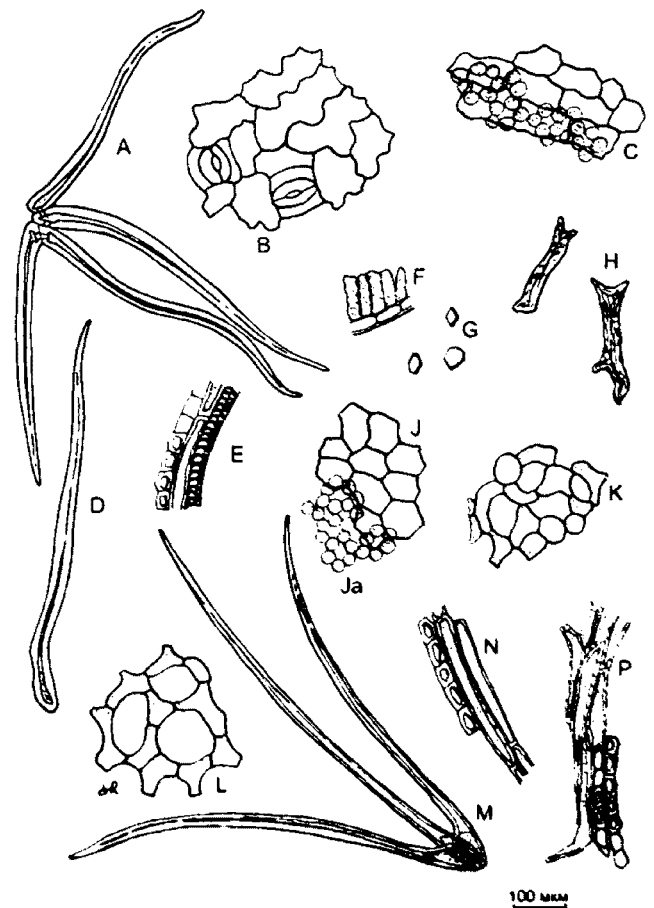


Рисунок 0909.-1. — Діагностичні структури гамамелісу листків (Ідентифікація В)

**Гідрастису канадського кореневища**

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл спирту (60 % об/об) Р, струшують протягом 15 хв і фільтрують.

*Розчин порівняння (а).* 30 мг кислоти танінової Р розчиняють у 5 мл спирту (60 % об/об) Р.

*Розчин порівняння (b).* 5 мг кислоти галлової Р розчиняють у 5 мл спирту (60 % об/об) Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* кислота мурашина безводна Р - вода Р - етилформіат Р (10:10:80).

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв, потім охолоджують.

*Виявлення:* обприскують розчином заліза(III) хлориду Р до виявлення блакитнуватого-сірих зон (фенольні сполуки).

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину у нижній третині має виявлятися основна зона на рівні основної зони на хроматограмі розчину порівняння (а), у верхній частині — вузька зона на рівні основної зони на хроматограмі розчину порівняння (b). На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також декілька слабо забарвлених зон у центральній частині.

**ВИПРОБУВАННЯ**

*Сторонні домішки (2.8.2).* Не більше 7 % стебел і не більше 2 % інших сторонніх домішок. Визначення проводять із 50 г сировини.

*Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).* Не більше 10.0 %. 2.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 4 год.

*Загальна зола (2.4.16).* Не більше 7.0 %.

*Зола, не розчиняна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).* Не більше 2.0 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Визначення танінів проводять як зазначено у статті (2.8.14). Використовують 0.750 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12).

**ГІДРАСТИСУ КАНАДСЬКОГО  
КОРЕНЕВИЩА****Hydrastis rhizoma****GOLDENSEAL RHIZOME**

Цілі або різані, висушені кореневища та корені *Hydrastis canadensis* L.

*Вміст:*

- *гідрастину* ( $C_{21}H_{21}NO_6$ ; М.м. 383.4): не менше 2.5 %, у перерахунку на суху сировину;
- *берберину* ( $C_{20}H_{19}NO_4$ ; М.м. 336.4): не менше 3.0 %, у перерахунку на суху сировину.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.** Кореневище звивисте та вузлувате, близько 5 см завдовжки та 5-10 мм завтовшки. Поверхня жовтавого або коричнюватого-сірого кольору, безладно зморшкувата, із залишками численних тонких, гнучких коренів; основи стебел і лускоподібних листків трапляються на верхній поверхні. Злам рівний і смолистий. Поверхня поперечного зрізу жовтаво-коричнева, на зрізі представлені досить широка кора, коло із близько від 12 до 20 ізольованих провідних пучків і велика, пухка серцевина.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (180) (2.9.12). Порошок зеленувато-жовтого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *розчин хлоральгідрату* Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1831.-1): численні фрагменти тонкостінної паренхіми [А, G, К]; зрідка фрагменти жовтаво-коричневого корка кореневища та коренів — вигляд із поверхні [J] або вигляд у поперечному розрізі [F]; групи дрібних судин із помітними перфораціями на скошених кінцях стінок [L] та простими або облямованими, щілиноподібними порами [B, D, E]; зрідка групи тонкостінних, пористих волокон [H], звичайно об'єднаних із судинами; численні яйцеподібні або кулясті, оранжево-коричневі зернисті грудочки. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) *глицерину* Р. У порошку виявляються: крохмальні зерна [С], переважно прості, а деколи складні із до 4 компонентів; крохмальні зерна дрібні, кулясті або яйцеподібні, близько до 10 мкм у діаметрі, зрідка із невеликим округлим або щілиноподібним центром крохмалеутворення.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 250 мг сировини, здрібненої на порошок (180) (2.9.12), додають 4 мл суміші 20 мл води Р і 80 мл метанолу Р, витримують в ультразвуковій бані протягом 10 хв і фільтрують. Одержаний залишок промивають 2 порціями, по 2 мл

кожна, метанолу *P*, промивні рідини об'єднують і доводять метанолом *P* до об'єму 20 мл.

**Розчин порівняння.** Безпосередньо перед використанням 5 мг гідрастину гідрохлориду *P* і 5 мг берберину хлориду *P* розчиняють у 20 мл метанолу *P*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P* (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P* (2-10 мкм)).

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна *P* - вода *P* - етилацетат *P* (10:10:80).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл (або 2 мкл), смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см (або 6 см) від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
берберин: яскрава жовта флуоресцююча зона	яскрава жовта флуоресцююча зона (берберин)
гідрастин: темно-синя флуоресцююча зона	темно-синя флуоресцююча зона (гідрастин)
	яскрава світло-синя флуоресцююча зона (гідрастинін)
	темно-синя флуоресцююча зона
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ВИПРОБУВАННЯ

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 8.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 4.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

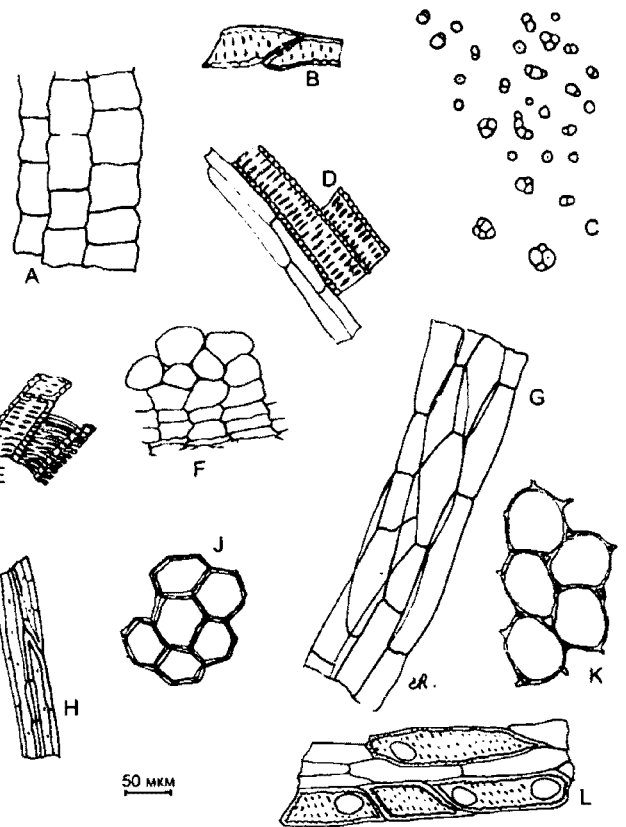


Рисунок 1831.-1. — *Діагностичні структури гідрастису канадського кореневища (Ідентифікація В)*

**Випробовуваний розчин.** 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 50 мл розчину 1 % (об/об) аміаку концентрованого *P* у 96 % спирті *P*. Одержану суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують до кімнатної температури та фільтрують крізь тампон із вати у колбу. Додають тампон із вати у круглодонну колбу й екстрагують двома порціями, по 30 мл кожна, розчину 1 % (об/об) аміаку концентрованого *P* у 96 % спирті *P*, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв. Кожний екстракт фільтрують крізь тампон із вати у колбу. Об'єднані фільтрати фільтрують крізь паперовий фільтр у круглодонну колбу місткістю 250 мл, обполіскуючи колбу та фільтр 20 мл 1 % (об/об) розчину аміаку концентрованого *P* у 96 % спирті *P*. Одержаний фільтрат упарюють насухо у вакуумі у водяній бані при температурі 55 °С. Одержаний залишок розчиняють у 50 мл рухомої фази. 10 мл цього розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50 мл.

**Розчин порівняння.** Безпосередньо перед використанням 10.0 мг ФСЗ гідрастину гідрохлориду і 10.0 мг ФСЗ берберину хлориду розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину до 100 мл тим самим розчинником.

**Колонка:**

— розмір: 0.125 м × 4 мм;

— нерухома фаза: силікагель ендкепований октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм).

**Дуба кора**

**Рухома фаза:** 9,93 г калію дигідрофосфату *P* розчиняють у 730 мл води *P*, додають 270 мл ацетонітрилу *P* і змішують.

**Швидкість рухомої фази:** 1,2 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 235 нм.

**Об'єм інжекції:** 10 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

- **порядок виходу піків:** має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння; відмічають часи утримування цих речовин;
- **коефіцієнт розділення:** не менше 1,5 для піків гідрастину та берберину.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Вміст кожного алкалоїду (гідрастину та берберину), у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1} \times 2,5,$$

де:

- $A_1$  — площа піка гідрастину або берберину на хроматограмі випробовуваного розчину;
- $A_2$  — площа піка гідрастину або берберину на хроматограмі розчину порівняння;
- $m_1$  — маса наважки сировини, використаної для приготування випробовуваного розчину, у грамах;
- $m_2$  — маса наважки гідрастину гідрохлориду або берберину хлориду, використаного для приготування розчину порівняння, у грамах;
- $p$  — вміст гідрастину у ФСЗ гідрастину гідрохлориду або берберину у ФСЗ берберину хлориду, у відсотках.

**ДУБА КОРА****Quercus cortex****OAK BARK**

Різана, висушена кора свіжозаготовлених молодих пагонів *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. та *Q. pubescens* Willd.

**Вміст:** не менше 3,0 % танінів, у перерахунку на пірогалол ( $C_6H_6O_3$ ; *M.m.* 126,1) і суху сировину.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**A.** Сировина — це жолобчасті або зморщені шматочки кори завтовшки не більше 3 мм. Зовнішня поверхня світло-сірого або зеленувато-сірого кольору, частіше гладенька, зрідка із сочевичками. Внутрішня поверхня блідо-коричневого або червонувато-коричневого кольору із дещо рельєфними подовжніми борозенками близько від 0,5 мм до 1 мм завширшки. Злам заїдливий і волокнистий.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок світло-коричневого або червонувато-коричневого кольору, волокнистий. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошок виявляються: групи товстостінних волокон, оточених помірно потовщеними паренхімними обкладками, що містять призми кристалів кальцію оксалату; фрагменти корка із тонкостінних таблитчастих клітин із коричнюватим або червонуватим вмістом; численні поодинокі або у групах склерейди, деякі — великі, із потовщеними багат шаровими оболонками та розгалуженими порами, інші — меншого розміру, із тонкими оболонками та простими порами, часто із густим коричневим вмістом; фрагменти паренхіми, що містять друзи кальцію оксалату; іноді трапляються фрагменти тонкостінних ситовидних трубок із ситовидними полями на скошених кінцях оболонки.

**C.** До 1 г здрібною на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 10 мл спирту (30 % об/об) *P*, нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують. До 1 мл одержаного розчину додають 2 мл розчину 10 г/л ваніліну *P* у кислоті хлористоводневій *P*; з'являється червоне забарвлення.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Втрата в масі при висушуванні** (2.2.32). Не більше 10,0 %. 1.000 г здрібною на порошок сировини (710) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола** (2.4.16). Не більше 8,0 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Проводять визначення вмісту танінів у лікарських засобах рослинного походження (2.8.14), використовуючи 0,700 г здрібною на порошок сировини (710) (2.9.12).

Допускається ідентифікацію *A* проводити за наведеними вище ознаками із таким доповненням.

**A.** Сировина - жолобчасті та зморщені шматочки кори завтовшки звичайно не більше 3 мм (до 6 мм).

Рекомендується додатково проводити ідентифікацію D.

D. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфата безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл етилацетату Р.

**Розчин порівняння.** До 0.1 г ФСЗ ДФУ дуба екстракту сухого додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфату безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл етилацетату Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р- ефір Р- гексан Р- етилацетат Р (20:20:20:40).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом від 10 хв до 15 хв.

**Виявлення:** обприскують свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р; виявляються червонуваті зони. Пластинку витримують у парі аміаку; зони стають інтенсивнішими, червонувато-коричневими. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися також інші слабкі зони.

Верхня частина пластинки	
слаба зона	слаба зона
інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)	інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)
слаба зона	слаба зона
інтенсивна зона	інтенсивна зона
слаба зона	слаба зона
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

Допускається використання сировини із таким нормуванням.

**Вміст:** не менше 2.5 % танінів, у перерахунку на пірогалол ( $C_6H_6O_3$ ; М.м. 126.1) і суху сировину.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5 % шматків кори, потемнілих із внутрішньої поверхні; не більше

5 % шматків кори більше 6 мм завтовшки; не більше 2 % сторонніх часток, у тому числі не більше 1 % домішок мінерального походження.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 15 %. 1.000 г здрібненої на порошок (710) (2.9.12) сировини сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

За наявністю необхідного наукового обґрунтування допускається введення в окрему статтю інших підхожих методик визначення, показників якості та/або їх нормування.

## ДУРМАНУ ЛИСТЯ

### Stramonii folium

#### STRAMONIUM LEAF

Висушені листки або висушені листки та квітучі, зрідка плодоносні верхівки *Datura stramonium* L. та його різновидів.

**Вміст:** не менше 0.25 % алкалоїдів, у перерахунку на гіосціамін ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ; М.м. 289.4) і суху сировину. Алкалоїди представлені переважно гіосціаміном із різними кількісними співвідношеннями гіосцину (скополаміну).

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має неприємний запах.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. Листки від темно-коричнювато-зеленого до темно-сірувато-зеленого кольору, із коротким черешком, часто дуже скручені та зморщені під час сушіння, тонкі та ламкі, від яйцеподібної до трикутно-яйцеподібної форми, зубчастолопатевої, із загостреною верхівкою та часто асиметричною основою. Молоді листки опушені вздовж жилок, старіші листки майже голі. Стебла від зеленого до фіолетово-зеленого кольору, прямостоячі, зігнуті та скручені, подовжньо та деколи поперечно зморшкуваті, галузяться дихазально, із поодинокими квітками або недозрілими плодами у розвилках. Квітки на коротких квітконіжках, мають зрослолисту чашечку із 5 лопатями та лійкоподібний віночок від коричнювато-білого до червонуватого кольору. Плід — коробочка, звичайно вкрита численними короткими, жорсткими шипами; насінини коричневого або чорного кольору, із дрібно ямчатою шкіркою.



В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок сірвато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошок виявляються: фрагменти пластинки листка із клітин епідерми із дещо звивистими антиклінальними оболонками та гладенькою кутикулою; продихові апарати анізоцитного або аномоцитного типів (2.8.3), більш численні на нижній епідермі; покривні волоски конічні, однорядні із 3-5 клітин із бородавчастими оболонками; залозисті волоски короткі, булавоподібні, із голівкою із 2-7 клітин; дорзовентральний мезофіл із одним шаром па-

лісадних клітин та губчастою паренхімою, клітини якої містять друзи кальцію оксалату; кільчасті та спіральні судини. У здрібненій на порошок сировині мають також виявлятися: волокна та сітчасті судини стебла; півкулясті пилокві зерна близько від 60 мкм до 80 мкм у діаметрі із 3 проростковими порами та майже гладенькою екзиною; фрагменти віночка із сосочкоподібних клітин епідерми; фрагменти насінин, які містять жовтаво-коричневі, звивисті, товстостінні склереїди насінної шкірки; зрідка призми та дрібнокулясті кристали кальцію оксалату.

С. Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Хроматографія».

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися основні зони на рівні основних зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за розміром і забарвленням.

Д. 1 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) струшують із 10 мл 0.05 М розчину кислоти сірчаної протягом 2 хв, фільтрують, до одержаного фільтрату додають 1 мл розчину аміаку концентрованого Р і 5 мл води Р, обережно струшують із 15 мл ефіру, вільного від пероксидів, Р, запобігаючи утворенню емульсії. Ефірний шар відділяють, висушують над натрію сульфатом безводним Р, фільтрують і випарюють ефір у фарфоровій чашці. Додають 0.5 л кислоти азотної Р і упарюють насухо на водяній бані. Додають 10 мл ацетону Р і краплями розчин 30 г/л калію гідроксиду Р у 96 % спирті Р; з'являється темно-фіолетове забарвлення.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Хроматографія.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) додають 10 мл 0.05 М розчину сірчаної кислоти, струшують протягом 15 хв і фільтрують. Промивають фільтр 0.05 М розчином кислоти сірчаної до одержання фільтрату об'ємом 25 мл. До одержаного фільтрату додають 1 мл розчину аміаку концентрованого Р і струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, ефіру, вільного від пероксидів, Р. Якщо необхідно, відділяють центрифугуванням. Висушують об'єднані шари ефіру над натрію сульфатом безводним Р, фільтрують і упарюють насухо на водяній бані. Одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл метанолу Р.

*Розчин порівняння.* 50 мг гіосціаміну сульфату Р розчиняють у 9 мл метанолу Р. 15 мг гіосцину гідроброміду Р розчиняють у 10 мл метанолу Р. Змішують 3.8 мл розчину гіосціаміну сульфату та 4.2 мл розчину гіосцину гідроброміду та доводять об'єм розчину метанолом Р до 10 мл.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* розчин аміаку концентрований Р - вода Р - ацетон Р (3:7:90).

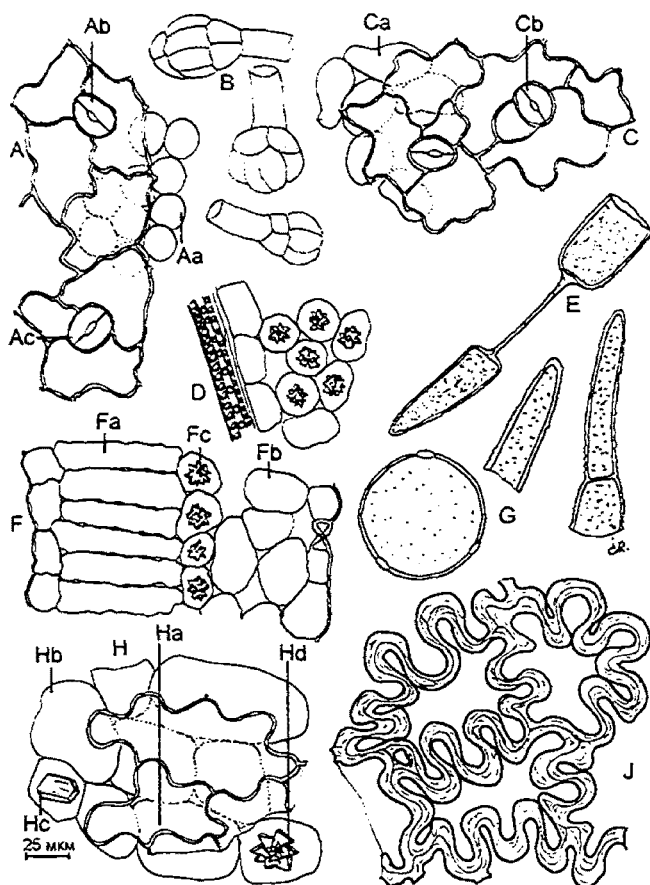


Рисунок 0246.-1. Діагностичні структури дурману листків (Ідентифікація В)

- A. Верхня епідерма пластинки листка із прилеглою палісадною паренхімою (Aa) та продиховими апаратами аномоцитного (Ab) або анізоцитного (Ac) типів (вигляд із поверхні)
- B. Залозисті волоски
- C. Нижня епідерма пластинки листка з прилеглою губчастою паренхімою (Ca) та продиховими апаратами анізоцитного (Cb) типу (вигляд із поверхні)
- D. Губчаста паренхіма, окремі клітини якої містять дрібні друзи кальцію оксалату, та кільчасті або спіральні судини (вигляд із поверхні)
- E. Багатоклітинні покривні волоски з бородавчастими оболонками
- F. Пластинка листка (на поперечному зрізі) із одним шаром палісадної паренхіми (Fa), губчастою паренхімою (Fb) та дрібними друзами кальцію оксалату (Fc)
- G. Пилкове зерно
- H. Епідерма пелюстки (Ha) (вигляд із поверхні) з прилеглими клітинами мезофілу (Hb), деякі із них містять призми (Hc) або друзи (Hd) кальцію оксалату
- J. Склерейди насінної шкірки

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл і 20 мкл, смугами 20 мм × 3 мм, відстань між смугами 1 см.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв, потім охолоджують.

**Виявлення А:** обприскують розчином *калію йодовісмутату Р2*, використовуючи 10 мл на пластинку площею 200 мм<sup>2</sup> доки оранжева або коричнева зони не будуть видимі на жовтому фоні.

**Результати А:** на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зони (гіосціамін у нижній третині, гіосцин у верхній третині хроматограми) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням. Зони на хроматограмі випробовуваного розчину дещо відрізняються за розміром від відповідних зон на хроматограмі відповідних об'ємів розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину у середній частині (20 мкл) або близько лінії старту (10 мкл) можуть виявлятися слабші другорядні зони.

**Виявлення В:** обприскують розчином *натрію нітриту Р* до одержання прозорого шару; переглядають через 15 хв.

**Результати В:** зони, відповідні гіосціаміну на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння, мають змінити забарвлення від коричневого до червонувато-коричневого, але не сіруватосинього (атропін), другорядні зони зникають.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 3.0 % стебел більше 5 мм у діаметрі.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 20.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 4.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

а) Визначають втрату в масі при висушуванні (2.2.32) із 2.000 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) при температурі 105 °С.

б) 10.0 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) змочують сумішшю 5 мл *розчину аміаку Р*, 10 мл 96 % *спирту Р* і 30 мл *ефіру, вільного від пероксидів, Р* і ретельно перемішують. Одержану суміш переносять до підходящого перколятора, якщо необхідно за допомогою екстрагуючої суміші. Проводять настоювання протягом 4 год і перколюють сумішшю *хлороформ Р - ефір, вільний від пероксидів, Р* (1:3), доки алкалоїди повністю не екстрагуються. Декілька мілілітрів рідини із перколятора упарюють насухо, одержаний залишок розчиняють у 0.25 М *розчині кислоти сірчаної* та перевіряють відсутність алкалоїдів розчином *калію тетраіодомеркурату Р*. Одержаний перколят випарюють до об'єму близько

50 мл на водяній бані та переносять у ділильну лійку, обполіскуючи *ефіром, вільним від пероксидів, Р*. Додають *ефір, вільний від пероксидів, Р* у кількості не менше 2.1 об'єму перколяту, щоб одержати рідину із густиною меншою густини води. Одержаний розчин струшують не менше як із 3 порціями, по 20 мл кожна, 0.25 М *розчину кислоти сірчаної*, якщо необхідно відділяють два шари центрифугуванням, і переносять кислотний шар у другу ділильну лійку. Одержаний кислотний шар підлужнюють *розчином аміаку Р* і струшують із 3 порціями, по 30 мл кожна, *хлороформу Р*. Хлороформні шари об'єднують, додають 4 г *натрію сульфату безводного Р* і витримують 30 хв при обережному струшуванні. Хлороформ декантують і промивають *натрію сульфат безводний* 3 порціями, по 10 мл кожна, *хлороформу Р*. Одержану промивну рідину додають до екстракту, упарюють насухо на водяній бані при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. Одержаний залишок розчиняють у декількох мілілітрах *хлороформу Р*, додають 20 мл 0.01 М *розчину кислоти сірчаної* та видаляють *хлороформ* випарюванням на водяній бані. Надлишок *кислоти титрують* 0.02 М *розчином натрію гідроксиду*, використовуючи як індикатор *метилового червоного змішаний розчин Р*.

Вміст суми алкалоїдів, у перерахунку на гіосціамін, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{57.88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

де:

*d* — втрата в масі при висушуванні, у відсотках;

*n* — об'єм 0.02 М *розчину натрію гідроксиду*, у мілілітрах;

*m* — маса наважки сировини, у грамах.

## ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від вологи місці.

## ЗІРЧАСТИЙ АНІС

## Anisi stellati fructus

## STAR ANISE

Сухий апокарпний плід – багатолістянка (збірна лістянка) *Illicium verum* Hooker fil.

## Вміст:

- не менше 70 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на безводну сировину,
- не менше 86.0 % *транс*-анетолу в ефірній олії.

## ВЛАСТИВОСТІ

Плодики – лістянки коричневого кольору.

Сировина має запах анетолу.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Плід звичайно складається із 8 розвинених, однонасіньних лістянок, кожна із них (12–22) мм завдовжки та (6–12) мм заввишки, розташовані вони радіально навколо короткої, центральної, притупленої на кінці колонки. У деяких плодів 1 або 2 лістянки можуть бути відсутніми, але місце їх прикріплення чітко видиме. Кожна лістянка човникоподібна або черевикоподібна, зі спинною поверхнею сірувато-коричневого кольору і шорсткою структурою та бічними поверхнями із рубцями від сусідніх лістянок. Одна або більше лістянок розкриті вздовж черевного шва, тому в них видима одна лінзоподібна, блискуча, червонувато-коричнева насінина близько 8 мм у діаметрі. Структури на спинній поверхні не видимі із черевної поверхні. Деякі лістянки (1–3) можуть бути недорозвиненими. Можуть бути наявними ізольовані лістянки, плодоніжки та насінини.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин *хлоральгідрату Р*. У порошку виявляються: фрагменти екзокарпія коричневого кольору із багатокутних клітин (вигляд із поверхні) із дуже складчастою кутикулою та зрідка із продихових апаратів аномоцитного типу (2.8.3); фрагменти ендокарпія із видовжених палісадоподібних клітин; фрагменти мезокарпія із великих паренхімних клітин, судин, олієвмісних клітин та груп кам'янистих клітин; фрагменти насінної шкірки із палісадоподібних, склерифікованих, густо пористих клітин жовтого кольору, близько 200 мкм завдовжки; фрагменти колонки і плодоніжки із кам'янистих клітин близько 400 мкм завдовжки та 150 мкм завширшки, зірчастої форми, із дуже та безладно потовщеними оболонками; ромбоподібні або прямокутні кристали кальцію оксалату.

**С.** Переглядають хроматограми, одержані у випробуванні В для *Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) та інших відомих видів *Illicium ssp.*

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. Крім того, на хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші менш інтенсивні зони.

Верхня частина пластинки	
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин
кислота кофейна: блакитна флуоресцююча зона	
кверцитрин: коричнювато-жовта флуоресцююча зона	коричнювато-жовта флуоресцююча зона
	сірувата флуоресцююча зона
гіперозид: коричнювато-жовта флуоресцююча зона	коричнювато-жовта флуоресцююча зона
кислота хлорогенова: блакитна флуоресцююча зона	зелена флуоресцююча зона
рутин: коричнювато-жовта флуоресцююча зона	коричнювато-жовта флуоресцююча зона

## ВИПРОБУВАННЯ

*Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) та інші відомі види *Illicium ssp.*

**А.** Домішка *Illicium anisatum* або інших відомих видів *Illicium ssp.* виявляється за наявністю плодів, що складаються переважно із більш ніж 8 лістянок; плодів, кожен із яких менший 2.5 см або більший 3.5 см; лістянки із загостреним швом, із потовщенням, спрямованим до сусідньої лістянки, або зі структурами спинної поверхні, видимими через черевну поверхню; лістянки дещо хвилясті та закінчуються тонким дзьобиком або невеликим вентрально зігнутим крючком; лістянки збоку прямокутні; плодоніжки більше 5 см завдовжки; безнасінні плоди; насінини або дуже сплюснені, або майже кулясті.

**В.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 2.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл *метанолу Р*, нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі 60 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 1 мг кислоти кофейної Р, 1 мг кислоти хлорогенової Р, 2.5 мг кверцитрину Р, 2.5 мг рутину Р і 2.5 мг гіперозиду Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10 мкм).

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - кислота оцтова льодяна Р - вода Р - етилацетат Р (11:11:26:100).

**Об'єм проби, що наноситься:** 5 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 6 см від лінії старту.

**Висушування:** у струмені теплого повітря.

**Виявлення:** пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р; через 30 хв переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися коричнювато-жовта флуоресцююча зона на рівні або над зоною, відповідною кверцитрину на хроматограмі розчину порівняння. Не має виявлятися жовта флуоресцююча зона на рівні або над зоною, відповідною кислоті кофейній на хроматограмі розчину порівняння. Не має виявлятися коричнювато-жовта флуоресцююча зона над зоною, відповідною гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння.

**Вода (2.2.13).** Не більше 100 мл/кг. Визначають методом відгону із 20.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12).

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 4.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Ефірна олія.** Проводять визначення як зазначено у статті (2.8.12). Використовують круглодонну колбу місткістю 250 мл і 100 мл води Р як дистиляційну рідину. 50.0 г сировини безпосередньо перед випробуванням подрібнюють на грубий порошок (1400) (2.9.12) і перемішують. 10.0 г цієї суміші подрібнюють на дрібніший порошок (710) (2.9.12). Використовують 2.50 г одержаного порошку та 0.50 мл ксилолу Р у градуйованій трубі. Дистиляцію проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 2 год.

**транс-Анетол.** Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

**Випробовуваний розчин.** Суміш ефірної олії і ксилолу Р, одержану при кількісному визначенні ефірної олії, доводять ксилолом Р до об'єму 5.0 мл, обполісуючи апарат.

**Розчин порівняння.** До 1.0 мл ксилолу Р додають 20 мкл естрагалу Р, 20 мг  $\alpha$ -терпінеалу Р і 60 мкл анетолу Р.

**Колонка:**

— матеріал: кварц;

— розмір: 30 м × 0.25 мм;

— нерухома фаза: макрогелю 20000 Р.

**Газ-носії:** гелій для хроматографії Р.

**Лінійна швидкість газу-носія:** 1.0 мл/хв.

**Поділ потоку:** 1:100.

**Температура:**

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 - 5	60
	5 - 80	60 → 210
	80 - 95	210
Блок вводу проб		200
Детектор		220

**Детектор:** полуменево-іонізаційний.

**Об'єм інжекції:** 1 мкл.

**Порядок виходу піків:** має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 5 для піків естрагалу та  $\alpha$ -терпінеолу.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів розчину порівняння на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст транс-анетолу, у відсотках.

Не враховують пік розчинника або пік, площа якого менша 0.05 % площі основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину.

## ІМБИР

### Zingiberis rhizoma

#### GINGER

Цілі або різані, висушені кореневища *Zingiber officinale* Roscoe із повністю видаленим корком або із корком, видаленим лише із широких плоских поверхонь.

**Вміст:** не менше 15 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на безводну сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має характерний ароматний запах, пряний та пекучий смак.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Кореневище сплюснуте із боків, на верхній стороні несе короткі, сплюснуті, оберненоїшеподібні висхідні пагони, що зрідка мають сплюснутий рубець на верхівці: цілі кореневища близько від 5 см до 10 см завдовжки, від 1.5 см до 3 см або 4 см завширшки та від 1 см до 1.5 см завтовшки, іноді розщеплені уздовж. Очищене кореневище зі світло-коричневою зовнішньою поверхнею із подовжніми смугами та зрідка вільними волокнами; зовнішня поверхня неочищеного кореневища від світло- до темно-коричневого кольору та більш або менш вкрита корком із помітними, вузькими, подовжніми та поперечними складками; корок легко відшаровується від бічної поверхні, але утримується між пагонами. Злам рівний, крохмалистий, із волокнами, що стирчать. На поперечному зрізі виявляється тонка кора, відділена ендодермою від значно ширшого центрального циліндра; у ньому виявляються численні, безладно розташовані судинно-волокнисті пучки та численні, безладно розташовані смолівмісні клітини зі вмістом жовтого кольору. Неочищене кореневище, крім того, має зовнішній шар темно-коричневого корка.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок ід світло-жовтого до коричнюватого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1522.-1): групи великих, тонкостінних, септованих волокон, одна стінка яких часто зубчата [C, D, G]; фрагменти [K], у складі яких наявні судини із сітчастим потовщенням [Ka], які часто супроводжуються вузькими, тонкостінними клітинами, що містять коричневий пігмент [Kb], і крохмаловмісна паренхіма [Kc]; численні сітчасті судини, досить крупні, ізольовані [H, L]; численні тонкостінні клітини основної паренхіми [J, M], деякі із них містять смоли коричневого кольору [Ja]; фрагменти коричневого корка, що, звичайно, видимий при перегляді із поверхні [F], але зрідка у поперечному розрізі [E]. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину *P*. У порошку виявляються численні крохмальні зерна, прості, сплюснуті, видовженої або овальної, або неправильної форми, близько 50 мкм завдовжки та 25 мкм завширшки, із невеликими крапочками центрів крохмалеутворення у гострому кінці; іноді крохмальні зерна зі слабою поперечною шаруватістю і можуть бути вільними [A], зібраними разом [B] або включеними у клітини паренхіми [Kc].

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 5 мл метанолу *P*, струшують протягом 15 хв і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 10 мкл цитралю *P* і 10 мг резорцину *P* розчиняють у 10 мл метанолу *P*. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

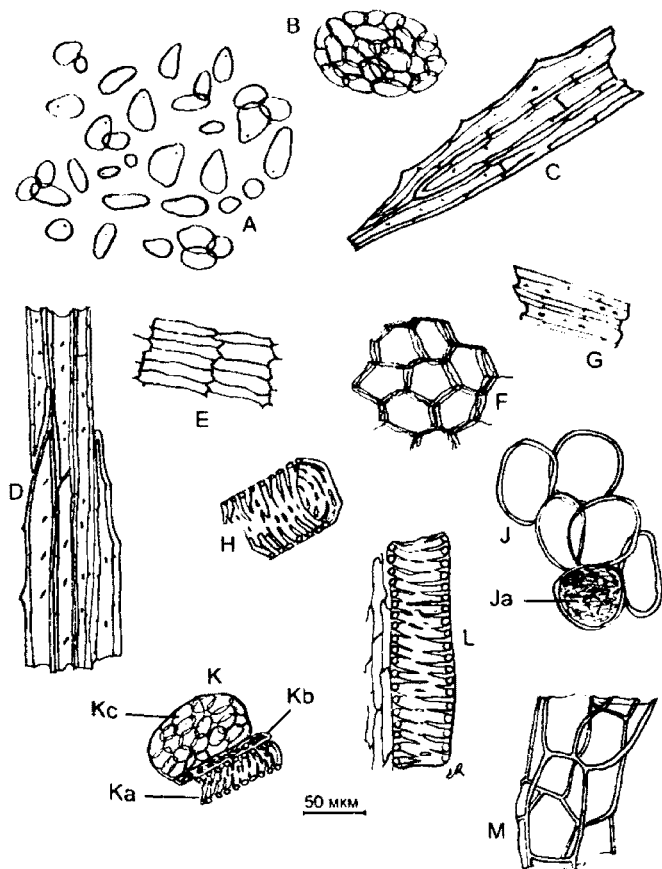


Рисунок 1522.-1. Діагностичні структури імбиря (Ідентифікація В)

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** гексан *P* - ефір *P* (40:60).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту. Пластинку поміщають у ненасичену камеру.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином 10 г/л ваніліну *P* у кислоті сірчаній *P* і переглядають при денному світлі при нагріванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній половині — зона інтенсивного червоного забарвлення (резорцин), у верхній половині — дві фіолетові зони (цитраль). На хроматограмі випробуваного розчину мають виявлятися: нижче зони, відповідної резорцину на хроматограмі розчину порівняння, дві зони інтенсивного фіолетового забарвлення (гінгероли), у середній частині пластинки між зонами, відповідними резорцину і цитралю на хроматограмі розчину порівняння, дві зони менш інтенсивного фіолетового забарвлення (шогаоли). Можуть виявлятися також інші зони.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Вода** (2.2.13). Не більше 100 мл/кг. Визначення проводять методом дистляції із 20.0 г здрібненої на порошок (710) (2.9.12) сировини.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 6.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять як зазначено у статті (2.8.12). Використовують 20.0 г здрібненої на грубий порошок сировини, круглодонну колбу місткістю 1000 мл, 10 крапель *вазелинового масла* *P* або іншого протиспінювача, 500 мл *води* *P* як дистиляційну рідину та 0.5 мл *ксилолу* *P* у градуйованій трубці. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 4 год.

## КАСКАРА

### *Rhamni purshianae* cortex

#### CASCARA

Висушена, ціла або фрагментована кора *Rhamnus purshianus* DC. (син. *Frangula purshiana* (DC.) A. Gray).

*Вміст*: не менше 8.0 % гідроксіантраценових глікозидів, із яких не менше 60 % складають каскарозиди, у перерахунку на каскарозид А ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ ; *М.м.* 580.5) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Кора у вигляді дещо скручених або майже плоских шматочків, звичайно від 1 мм до 5 мм завтовшки, різних за довжиною та шириною. Зовнішня поверхня сірого або темно-сірувато-коричневого кольору, на ній зрідка трапляються сочевички, орієнтовані поперечно. Кора, звичайно, більш або менш повністю вкрита білуватим покривом лишайників, епіфітних мохів і листоподібних печіночників. Внутрішня поверхня жовтого, червонувато-коричневого або майже чорного кольору із тонкими подовжніми смугами; вона набуває червоного кольору під дією лугів. Жовтий злам рівний і зернистий зовні та дещо волокнистий у внутрішній частині.

**В.** Мікроскопічне дослідження (2.8.23). Порошок жовтаво-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *розчин хлоральгідрату* *P*. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 0105.-1): пучки [А] частково здерев'янілих флоемних волокон [Аа] із кристалоносними обкладками, що містять призми кальцію оксалату [Аb] та деколи оточують серцевинні промені [Ас]; окремі склереїди [С] або групи склереїд [В] із кристалоносними обкладками [Ва]; окремі

друзи [С] або призми [Е] кальцію оксалату; паренхімні клітини [F, H] зі вмістом жовтого кольору, що набуває темно-червоного кольору під дією лугів, і деколи супроводжуються клітинами із друзами кальцію оксалату [На]; клітини корка – вигляд із поверхні [D] або на поперечному зрізі [J] із прилеглою паренхімою, окремі клітини якої містять друзи кальцію оксалату [Ja]; часто епіфіти [К], що можуть бути печіночками, цілими або у фрагментах, які мають пластинку в одну клітину завтовшки, без середньої жилки, складається із клітин ізодіаметричної форми або листками мохів із пластинкою в одну клітину завтовшки, складається із клітин видовженої форми та має середню жилку із декількох клітин завтовшки.

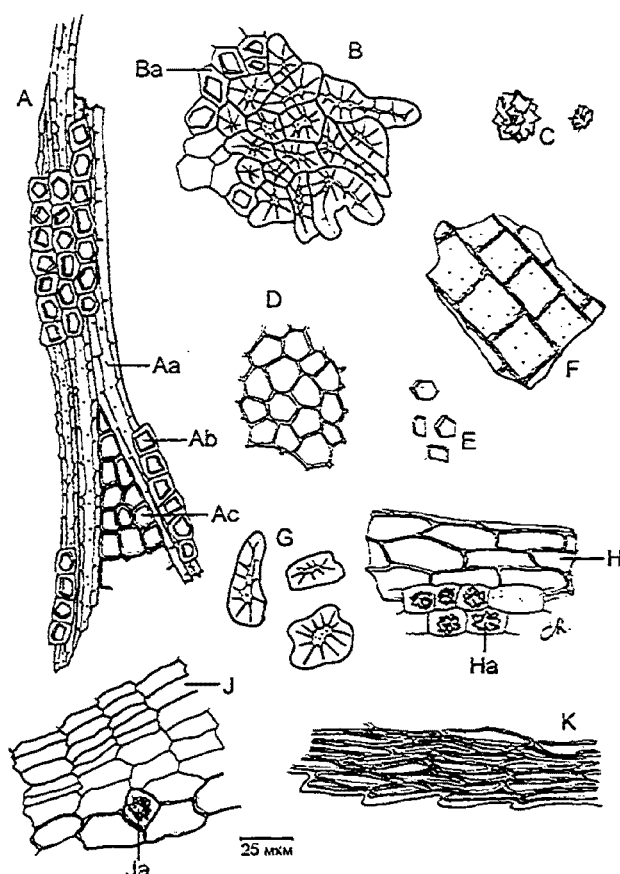


Рисунок 0105.-1. — Діагностичні структури каскари (Ідентифікація В)

**С.** Переглядають хроматограми, одержані у випробуванні А «Інші види *Rhamnus*; антрони».

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися декілька червонувато-коричневих зон різної інтенсивності: 4 зони слабкої флуоресценції, 3 — розташовані близько середньої точки хроматограми, 1 — у нижній третині та зона сильної флуоресценції у верхній третині хроматограми. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися декілька зон такої самої флуоресценції, розташованих вище та частково нижче (каскарозиди) зони барбалоїну на хроматограмі розчину порівняння.

0.2 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) нагрівають на водяній бані із 50 мл *води Р* протягом 15 хв, охолоджують і фільтрують. До 10 мл фільтрату додають 20 мл *кислоти хлористоводневої Р1*, нагрівають на водяній бані протягом 15 хв, охолоджують, переносять у ділительну лійку і струшують із 3 порціями, по 20 мл кожна, *ефіру Р*. Збирають водний шар (розчин А). Об'єднують 3 ефірні екстракти і струшують із 10 мл *розчину аміаку розведеного Р2*; водний шар набуває червонувато-фіолстового забарвлення. Переносять розчин А у невелику колбу, додають 5 г *хлориду заліза(III) Р*, нагрівають на водяній бані протягом 30 хв, охолоджують, переносять у ділительну лійку та струшують із 15 мл *ефіру Р*. Ефірний шар промивають 10 мл *води Р*, відкидають воду та струшують ефірний шар із 5 мл *розчину аміаку розведеного Р2*; водний шар набуває червоного забарвлення.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Інші види *Rhamnus*: автрони.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) додають 5 мл *спирту (70 % об/об) Р*, нагрівають до кипіння, охолоджують і центрифугують, відразу декантують надосадовий розчин і використовують протягом 30 хв.

**Розчин порівняння.** 20 мг *барбалоїну Р* розчиняють у *спирті (70 % об/об) Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром *силікагелю Р* (2 пластинки).

**Рухома фаза:** *вода Р - метанол Р - етилацетат Р* (13:17:100).

**А. Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 5 хв.

**Виявлення:** обприскують близько 10 мл розчину 50 г/л *калію гідроксиду Р* у *спирті (50 % об/об) Р* і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. Переглядають відразу після нагрівання.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння у центральній частині має виявлятися червонувато-коричнева зона, відповідна *барбалоїну*. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. Зона, відповідна *барбалоїну*, виявляє інтенсивну жовтаво-коричневу флуоресценцію. На хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися зона оранжево-коричневої флуоресценції між зоною, відповідною *барбалоїну*, та зонами, відповідними *каскарозидам*.

**В. Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл випробовуваного розчину, смугою.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі, не більше 5 хв.

**Виявлення:** відразу обприскують розчином 5 г/л *нітротетразолієвого синього Р* у *метанолі Р*. Переглядають відразу.

**Результати:** фіолетова або сірувато-блакитна зони не мають виявлятися.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 1 %.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 7.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Випробовування проводять у захищеному від яскравого світла місці протягом 24 год.**

1.00 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) перемішують із 100 мл киплячої *води Р*, продовжують кип'ятіння та перемішування протягом 5 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* до 100 мл, струшують, фільтрують і відкидають перші 20 мл фільтрату. 10.0 мл фільтрату переносять у ділительну лійку, додають 0.1 мл *1 М розчину кислоти хлористоводневої* та струшують із 2 порціями, по 20 мл кожна, суміші *ефір Р - гексан Р* (1:3). Об'єднані органічні витяги промивають 5 мл *води Р*, відкидають органічний шар і повертають промивні води до водного шару. Струшують змішані водні шари із 4 порціями, по 30 мл кожна, *етилацетату Р*, свіжопромитого *водою Р* (до 150 мл *етилацетату Р* додають 15 мл *води Р*, струшують протягом 3 хв і відстоюють), кожного разу продовжують відстоювання до одержання прозорого органічного шару. Етилацетатні витяги об'єднують. Водний шар використовують для кількісного визначення гідроксіантраценових глікозидів, відмінних від *каскарозидів*.

**Гідроксіантраценові глікозиди, відмінні від каскарозидів.** Переносять органічний шар у підхожу колбу, видаляють розчинник дистиляцією, упарюють майже насухо. Розчиняють залишок у 0.3-0.5 мл *метанолу Р* і переносять у мірну колбу, обполіскуючи 1<sup>ю</sup> колбу теплою *водою Р*, додають залишки до метанольного розчину, охолоджують і доводять об'єм розчину *водою Р* до 50.0 мл. 20.0 мл одержаного розчину переносять у круглодонну колбу місткістю 100 мл із притертою скляною пробкою, що містить 2 г *заліза(III) хлориду Р* і 12 мл *кислоти хлористоводневої Р*. При'єднують зворотний холодильник і поміщають колбу у водяну баню так, щоб рівень води був вищим ніж рівень рідини у колбі, нагрівають протягом 4 год, охолоджують, переносять розчин у ділительну

лійку і обполіскують колбу послідовно (3-4) мл / *M* розчину натрію гідроксиду і (3-4) мл води *P*, додаючи промивну рідину до ділильної лійки. Вміст ділильної лійки струшують із 3 порціями, по 30 мл кожна, суміші ефір *P* – гексан *P* (1:3). Об'єднані органічні шари промивають із 2 порціями, по 10 мл кожна, води *P* і відкидають промивні води. Органічну фазу розводять до 100.0 мл сумішшю ефір *P* – гексан *P* (1:3). 20.0 мл одержаної рідини обережно упарюють насухо на водяній бані та розчиняють залишок у 10.0 мл розчину 5 г/л магнію ацетату *P* у метанолі *P*. Вимірюють оптичну густина (2.2.25) одержаного розчину за довжини хвилі 440 нм і 515 нм, використовуючи метанол *P* як компенсаційну рідину. Результати аналізу вважаються не вірогідними, якщо відношення оптичної густини за довжини хвилі 515 нм до оптичної густини за довжини хвилі 440 нм менше 2.4.

Вміст гідроксіантраценових глікозидів, відмінних від каскарозидів, у перерахунку на каскарозид А, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 6.95}{m},$$

де:

*A* — оптична густина за довжини хвилі 515 нм,  
*m* — маса наважки сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання, що дорівнює 180.

**Каскарозиди.** Доводять об'єм водного шару водою *P* до 50.0 мл. Обробляють 20.0 мл одержаного розчину як описано для кількісного визначення гідроксіантраценових глікозидів, відмінних від каскарозидів. Вимірюють оптичну густина (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 440 нм і 515 нм. Результати аналізу вважаються не вірогідними, якщо відношення оптичної густини за довжини хвилі 515 нм до оптичної густини за довжини хвилі 440 нм менше 2.7.

Вміст каскарозидів, у перерахунку на каскарозид А, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 6.95}{m},$$

де:

*A* — оптична густина за довжини хвилі 515 нм,  
*m* — маса наважки сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання, що дорівнює 180.

## КОЛА

### Colae semen

#### COLA

Цілі або фрагментовані, висушені, звільнені від шкірки насінини *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. (*C. vera* K. Schum.) та її різновидів, а також *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl. (*Sterculia acuminata* P. Beauv.).

*Вміст:* не менше 1.5 % кофеїну (*M.m.* 194.2), у перерахунку на суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Насінини довгастої, деколи притупленої, майже чотирикутної форми, дещо деформовані в результаті взаємного тиску усередині плодів; вони варіюють за розміром і масою у межах від 5 г до 15 г; зовнішня поверхня тверда, гладенька, темно-коричнева, внутрішня поверхня червонувато-коричневого кольору. У *C. nitida* та її різновидів насінини розділені на 2 майже плоско-опуклі сім'ядолі, що звичайно відокремлені у комерційній сировині; сім'ядолі від 3 см до 4 см завдовжки, від 2 см до 2.5 см завширшки та від 1 см до 2 см завтовшки. У *C. acuminata* сім'ядолі дрібніші та розділені на 4-6 неправильних частин.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину *P*. У порошок виявляються: численні крохмальні зерна яйцеподібної або ниркоподібної форми, розміром від 5 мкм до 25 мкм, із концентричною шаруватістю і зірчастим, дещо ексцентричним центром крохмалеутворення; фрагменти тканини сім'ядолі із великих, товстостінних, червонуватих, багатокутних клітин, заповнених крохмальними зернами; зрідка фрагменти зовнішньої епідерми сім'ядолей.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5 мл спирту (60 % об/об) *P*, струшують механічно при температурі 40 °С протягом 30 хв і фільтрують.

*Розчин порівняння (а).* 25 мг кофеїну *P* розчиняють у 10 мл спирту (60 % об/об) *P*.

*Розчин порівняння (б).* 50 мг теоброміну *P* розчиняють у 10 мл рухомої фази та фільтрують.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  *P*.

*Рухома фаза:* вода *P* - метанол *P* - етилацетат *P* (10:13:77).



Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі протягом 5 хв.

Виявлення А: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати А: на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 основні зони поглинання на рівні відповідних зон на хроматограмах розчинів порівняння (а) і (б).

Виявлення В: обприскують сумішшю рівних об'ємів 96 % спирту Р та кислоти хлористоводневої Р, потім свіжоприготованим розчином 1 г йоду Р та 1 г калію йодиду Р у 100 мл 96 % спирту Р.

Результати В: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися червонувато-коричнева основна зона на рівні зони на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за забарвленням.

## ВИПРОБУВАННЯ

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 12.0 %. 2.00 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 9.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин. До 1.00 г ( $m_1$ ) здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 50 мл метанолу Р, нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують. Фільтр обполіскують 10 мл метанолу Р. Одержаний залишок за допомогою 50 мл метанолу Р видаляють із фільтра та обробляють, як зазначено вище. Одержані фільтрати поєднують, промивають у мірну колбу місткістю 200.0 мл і доводять об'єм розчину метанолом Р до 200.0 мл. 20.0 мл одержаного розчину переносять у круглодонну колбу і упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний осад за допомогою рухомої фази переносять у мірну колбу місткістю 50.0 мл і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл.

Розчин порівняння. 30.0 мг ( $m_2$ ) ФСЗ кофеїну та 15.0 мг теоброміну Р поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл, розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. 10 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу місткістю 100.0 мл і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

Колонка:

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

Рухома фаза: метанол Р - вода Р (25:75).

Швидкість рухомої фази: 1 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 272 нм.

Об'єм інжекції: вибрані об'єми кожного розчину; петльовий інжектор.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 2.5 для піків кофеїну та теоброміну. Якщо необхідно, коригують об'єм води Р у рухомій фазі.

Вміст кофеїну обчислюють за формулою:

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 50}{m_1 \times A_2},$$

де:

$A_1$  — площа піка кофеїну на хроматограмі випробовуваного розчину;

$A_2$  — площа піка кофеїну на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса наважки сировини, взята для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

$m_2$  — маса ФСЗ кофеїну, взята для приготування розчину порівняння, у грамах.

## КОРИЧНИК

### Cinnamomi cortex

#### CINNAMON

Висушена, звільнена від зовнішнього корка та прилеглої паренхіми кора пагонів, що виростили на обрізаному стовбурі *Cinnamomum verum* J. Presl.

Вміст: не менше 12 мл/кг ефірної олії.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має характерний ароматний запах.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Кора — це ущільнена суміш поодиноких або здвоєних трубочок близько від 0.2 мм до 0.8 мм завтовшки. Зовнішня поверхня гладенька, жовтаво-коричневого кольору із невизначеними рубцями від листків і пазушних бруньок і тонкими, білуватими, звивистими подовжніми смугами. Внутрішня по-

верхня дещо темніша і подовжньо смугаста. Злам рівний і волокнистий.

**В.** Мікроскопічне дослідження (2.8.23). Порошок від жовтавого до червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 0387.-1): округлі склереїди із пористими, борозенчастими, помірно потовщеними оболонками, окремі [Е, F] або у групах [С]; численні безбарвні поодинокі волокна, часто цілі [А] або фрагментовані [D] із вузькою порожниною та потовщеними, здерев'янілими оболонками із поодинокими порами; дрібні голчасті кристали кальцію оксалату в паренхімних клітинах [J]; дуже численні крапельки олії [В]. Фрагменти корка [G] відсутні або трапляються дуже рідко. Переглядають під мікроскопом використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину Р. У порошку виявляються численні крохмальні зерна [H].

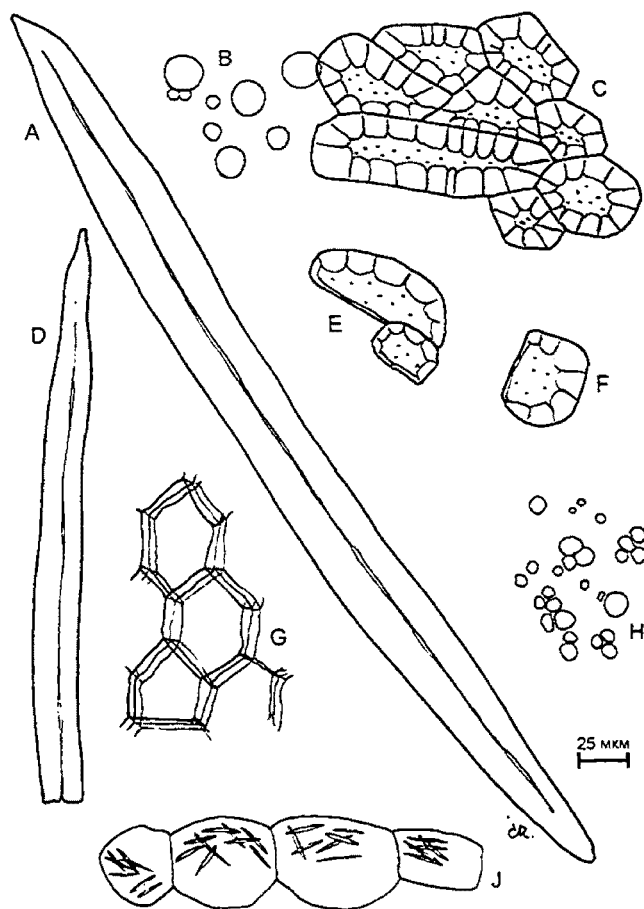


Рисунок 0387.-1. — Діагностичні структури кориці  
(Ідентифікація В)

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 1.0 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) струшують із 2 мл метиленхлориду Р протягом 15 хв і фільтрують. Одержаний фільтрат обережно упарюють майже насухо на водяній бані. Осад розчиняють у 0.4 мл толуолу Р.

**Розчин порівняння.** 50 мкл коричневого альдегіду Р і 10 мкл евгенолу Р розчиняють у толуолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю GF<sub>254</sub> Р.

**Рухома фаза:** метиленхлорид Р.

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами 20 мм × 3 мм.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення А:** переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм і відмічають зони поглинання, потім переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм і відмічають флуоресцюючі зони.

**Результати А:** на хроматограмах випробовуваного розчину і розчину порівняння в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм виявляються: зона поглинання, відповідна коричню альдегіду, у середній частині та дещо вище неї слабша зона поглинання, відповідна евгенолу. На хроматограмі випробовуваного розчину в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм виявляється зона світло-синьої флуоресценції, відповідна о-метоксикоричню альдегіду, дещо нижче зони, відповідної коричню альдегіду.

**Виявлення В:** обприскують розчином флороглюцину Р.

**Результати В:** зона, відповідна коричню альдегіду, має жовтаво-коричневий колір; зона, відповідна о-метоксикоричню альдегіду, має фіолетовий колір.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 6.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Ефірна олія.** Проводять визначення як зазначено у статті (2.8.12). Використовують 20.0 г свіжоздрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12), колбу місткістю 500 мл, 200 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої як дистиляційну рідину та 0.50 мл ксилолу Р у градуйованій трубці. Дистиляцію проводять зі швидкістю від 2.5 мл/хв до 3.5 мл/хв протягом 3 год.

## КОРИЧНИКА НАСТОЙКА

## Cinnamomi corticis tinctura

## CINNAMON TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Коричник».

## ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини та 5 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

## ВЛАСТИВОСТІ

Опис: Прозора рідина, коричнювато-червоного кольору, із характерним запахом.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 10 мл настойки, 10 мл розчину натрію хлориду насиченого Р і 5 мл толуолу Р поміщають у колбу із притертою пробкою, струшують протягом 2 хв і центрифугують протягом 10 хв; використовують органічний шар.

Розчин порівняння. 5 мкл евгенолу Р, 25 мкл транс-коричного альдегіду Р і 5 мкл транс-2-метоксикоричного альдегіду Р розчиняють у толуолі Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю G P.

Рухома фаза: метиленхлорид Р.

Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення А: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати А: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину.

Верхня частина пластинки	
транс-2-метоксикоричний альдегід: світло-блакитна флуоресціююча зона	світло-блакитна флуоресціююча зона (транс-2-метоксикоричний альдегід)
	зеленувата флуоресціююча зона (над лінією старту)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Виявлення В: обприскують розчином 200 г/л фосфорномолібденової кислоти Р у 96 % спирті Р, переглядають при денному світлі при нагріванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом від 5 хв до 10 хв.

Результати В: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	1 блакитна зона (терпенвуглеводні)
евгенол: блакитна зона	блакитна зона (евгенол)
транс-коричний альдегід: блакитна зона	блакитна зона (транс-коричний альдегід)
транс-2-метоксикоричний альдегід: оранжево-коричнева зона (колір поступово зникає)	слаба оранжево-коричнева зона (транс-2-метоксикоричний альдегід)
	2 або 3 блакитні зони вище лінії старту
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Етанол (2.9.10). Від 64 % об/об до 70 % об/об.

Метанол і 2-пропанол (2.9.11). Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

Сухий залишок (2.8.16). Не менше 1.5 % (м/м). Визначення проводять із 5.0 г.

## КОРІАНДР

## Coriandri fructus

## CORIANDER

Висушені вислоплідники (плоди) *Coriandrum sativum* L.

Вміст: не менше 3 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на суху сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Вислоплідник (плід) коричневого або світло-коричневого кольору, більш-менш кулястої форми.

близько від 1,5 мм до 5 мм у діаметрі, або овальної форми від 2 мм до 6 мм завдовжки.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Мерикарпії (півплодики) звичайно щільно з'єднані. Вистоплідник (плід) голий, із 10 звивистими, дещо підвищеними первинними ребрами та 8 прямими, більш виступаючими вторинними ребрами. Стиллоподій увінчує верхівку. Мерикарпії увігнуті на внутрішній поверхні. Невеличкий фрагмент плодоніжки може бути наявним.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгидрату Р. У порошок виявляються: численні крапельки олії; фрагменти ендосперму із дрібних, товстостінних, правильної форми клітин із мікрокристалами та мікророзетками кальцію оксалату та крапельками олії; фрагменти ендокарпія із дуже вузьких, розташованих у паркетному порядку клітин, що завжди супроводжуються шаром тонкостінних прямокутних склерейд мезокарпія; фрагменти склеренхімного шару мезокарпія із коротких, дуже товстостінних, пористих, веретеноподібних клітин, що залягають шарами, сусідні шари їх розташовані під прямими кутами один відносно іншого; фрагменти паренхіми із дрібних, товстостінних клітин; зрідка фрагменти провідних пучків.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 0,50 г свіжоздрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) струщують із 5,0 мл гексану Р протягом від 2 хв до 3 хв і фільтрують над 2 г натрію сульфата безводного Р.

*Розчин порівняння.* 15 мкл ліналолу Р і 25 мкл маслинової олії Р розчиняють у 5,0 мл гексану Р безпосередньо перед використанням.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* етилацетат Р - толуол Р (5:95).

*Об'єм проби, що наноситься:* 20 мкл випробовуваного розчину, 10 мкл розчину порівняння, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* по 10 см від лінії старту двічі.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* обприскують розчином анісового альдегіду Р і переглядають при денному світлі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом від 5 хв до 10 хв.

*Результати:* на хроматограмі розчину порівняння в нижній половині має виявлятися фіолетова або сірувато-фіолетова зона (ліналол), у верхній половині – синювато-фіолетова зона (тригліцериди). На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зони на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням.

На хроматограмі розчину порівняння між лінією старту і зоною ліналолу мають виявлятися декілька зон фіолетово-сірого або коричневатого кольору, включаючи зону, відповідну гераніолу. На хроматограмі розчину порівняння також можуть виявлятися декілька слабих фіолетово-сірих зон між зоною тригліцеридів і зоною ліналолу.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Сировина має витримувати випробовування. Не має бути плодів, пошкоджених тваринами.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10,0 %. 1.000 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 8,0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Проводять визначення вмісту ефірної олії (2.8.12). Використовують круглдонну колбу місткістю 500 мл, 200 мл води Р як дистиляційну рідину і 0,5 мл ксилолу Р у градуйованій трубці. Сировину подрібнюють на грубий порошок безпосередньо перед використанням. Визначення проводять із 30,0 г порошку. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 2 год.

N

*Допускається використання сировини із таким нормуванням.*

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 3 % пошкоджених, недорозвинених плодів; не більше 1 % ефіроолійної домішки (запашного насіння та плодів інших видів); не більше 2 % сторонніх часток, у тому числі не більше 1 % домішок мінерального походження.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 13 %. 1.000 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько від 100 °С до 105 °С.

*За наявністю необхідного наукового обґрунтування допускається введення в окрему статтю інших підходящих методик визначення, показників якості та/або їх нормування.*

## КРУШИНИ КОРА

## Frangulae cortex

## FRANGULA BARK

Ціла або фрагментована, висушена кора стебел і гілок *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* Miller).

**Вміст:** не менше 7.0 % глюкофрангулінів, у перерахунку на глюкофрангулін А ( $C_{27}H_{30}O_{14}$ ; М.м. 578.5) і суху сировину.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** У корі трапляються згорнуті, майже плоскі або трубчасті фрагменти або поодинокі, або здвоєні гофровані шматочки, звичайно, від 0.5 мм до 2 мм завтовшки та різної довжини та ширини. Зовнішня поверхня сірувато-коричневого або темно-коричневого кольору, подовжньо зморшкувата, із численними сіруватими, поперечно видовженими сочевичками; якщо зовнішні шари видалені, виявляється шар темно-червоного кольору. Внутрішня поверхня оранжево-коричневого або червонувато-коричневого кольору, гладенька та дрібно подовжньо смугаста; червоніє при взаємодії з лугами. Злам рівний, у внутрішній частині волокнистий.

**В.** Мікроскопічне дослідження (2.8.23). Порошок жовтавого або червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошок виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 0025.-1): численні, флоемні волокна у тангентальному [D] або у поздовжньому [K] розрізі, дещо здерев'янілі, у групах [Da, Ka], оточені кристалонесними обкладками із призмами кальцію оксалату [Db, Kb], деколи оточуючими серцевинні промені [Dc]; червонувато-коричневі фрагменти корка [H]; фрагменти флоемної паренхіми у поздовжньому розрізі [G] із друзами кальцію оксалату [A, E] або у тангентальному розрізі [C], оточуючі серцевинні промені [Ca], та клітини із друзами кальцію оксалату [Cb]; зрідка фрагменти коленхіми [F]; окремі друзи [B] та призми [J] кальцію оксалату.

**С.** Хроматограму, одержану у випробуванні А «Інші види *Rhamnus*; антрони», переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину у нижній третині мають виявлятися дві оранжево-коричневі зони (глюкофрангуліни) і у верхній третині 2-4 червоні зони (франгуліни, зони не завжди чітко розділені, над ними знаходиться зона, що відповідає франгула-емодину).

**Д.** До 50 мг здрібненої на порошок (180) (2.9.12) сировини додають 25 мл кислоти хлористоводневої

розведеної Р і нагрівають суміш на водяній бані протягом 15 хв, охолоджують, струшують із 20 мл ефіру Р і відкидають водний шар. Ефірний шар струшують із 10 мл розчину аміаку розведеного Р1. Водний шар набуває червонувато-фіолетового забарвлення.

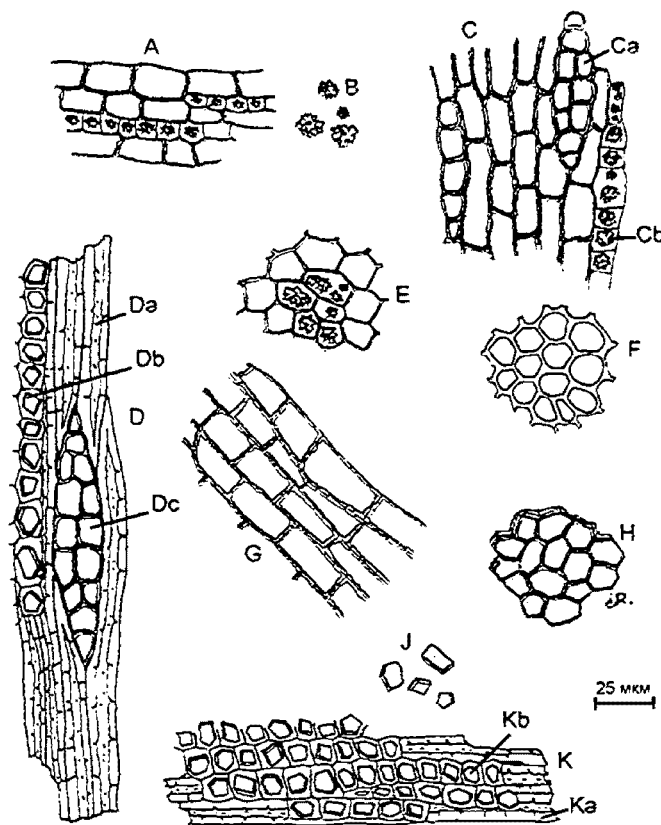


Рисунок 0025.-1. — Діагностичні структури крушини кори (Ідентифікація В)

## ВИПРОБУВАННЯ

**Інші види *Rhamnus*; антрони.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок (180) (2.9.12) сировини додають 5 мл спирту (70 % об/об) Р, нагрівають до кипіння, охолоджують і центрифугують. Надосадковий розчин відразу декантують і використовують його протягом наступних 30 хв.

**Розчин порівняння.** 20 мг барбалойну Р розчиняють у спирті (70 % об/об) Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластинки:** ТШХ пластинки із шаром силікагелю Р (2 пластинки).

**Рухома фаза:** вода Р - метанол Р - етилацетат Р (13:17:100).

**А.** Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 5 хв.

**Виявлення:** пластинку обприскують розчином 50 г/л калію гідроксиду Р у спирті (50 % об/об) Р, нагрівають

ють при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння у центральній частині має виявлятися коричнювато-жовта зона, відповідна барбалоїну. На хроматограмі випробованого розчину не мають виявлятися зони інтенсивної жовтої флуоресценції, зони оранжевої або червонуватої флуоресценції на рівні зони барбалоїну на хроматограмі розчину порівняння.

**В. Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл випробовуваного розчину, смугою.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 5 хв.

**Виявлення:** пластинку відразу обприскують розчином 5 г/л нітротетразолієвого синього Р у метанолі Р і відразу переглядають.

**Результати:** на хроматограмі не мають виявлятися фіолетові або сіривато-сині зони.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 1 %.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібноної на порошок (355) (2.9.12) сировини сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 6.0 %.

## КЛІЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Випробовування проводять у захищеному від яскравого світла місці.**

У попередньо зважену круглодонну колбу із притертою скляною пробкою зважують 0.250 г здрібноної на порошок (180) (2.9.12) сировини. У колбу додають 25.0 мл розчину 70 % (об/об) метанолу Р; перемішують, зважують, нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 15 хв, охолоджують, зважують і доводять розчином 70 % (об/об) метанолу Р до вихідної маси та фільтрують. 5.0 мл одержаного фільтрату переносять у ділильну лійку, додають 50 мл води Р і 0.1 мл кислоти хлористоводневої Р, струшують із 5 порціями, по 20 мл кожна, петролейного ефіру Р, витримують до розшарування та переносять водний шар у мірну колбу місткістю 100 мл. Ефірні шари об'єднують і промивають 2 порціями, по 15 мл кожна, води Р. Промивну рідину використовують для промивання ділильної лійки та додають до водного розчину у мірну колбу. Додають 5 мл розчину 50 г/л натрію карбонату Р, доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл, шар петролейного ефіру відкидають. 40.0 мл водного розчину переносять у круглодонну колбу із притертою скляною пробкою місткістю 200 мл, додають 20 мл розчину

200 г/л заліза(III) хлориду Р і нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані із рівнем води вищим за рівень рідини у колбі протягом 20 хв. Додають 2 мл кислоти хлористоводневої Р і продовжують нагрівати протягом ще 20 хв при енергійному струшуванні до розчинення осаду. Одержану суміш охолоджують, переносять у ділильну лійку та струшують із 3 порціями, по 25 мл кожна, ефіру Р, що попередньо використаний для промивання колби. Ефірні витяги об'єднують і промивають 2 порціями, по 15 мл кожна, води Р. Ефірний шар переносять у мірну колбу та доводять ефіром Р до об'єму 100.0 мл. 20.0 мл розчину обережно упарюють насухо та розчиняють залишок у 10.0 мл розчину 5 г/л магнію ацетату Р у метанолі Р.

Оптичну густина (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють за довжини хвилі 515 нм, використовуючи метанол Р як компенсаційну рідину.

Вміст глюкофрангулінів, у відсотках, у перерахунку на глюкофрангулін А, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 3.06}{m},$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 515 нм,

*m* — маса наважки сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання глюкофрангуліну А, що дорівнює 204.

*N*

*Допускається використання сировини із таким нормуванням.*

**Вміст:** не менше 6.0 % глюкофрангулінів, у перерахунку на глюкофрангулін А (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>; М.м. 578.5) і суху сировину.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 1 % шматків кори, вкритих кущистими лишайниками; не більше 1 % шматків кори із залишками деревини; не більше 3 % шматків кори завтовшки більше 2 мм; не більше 1 % сторонніх часток, у тому числі не більше 0.5 % домішок мінерального походження.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 15.0 %. 1.000 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

*За наявністю необхідного наукового обґрунтування допускається введення в окрему статтю інших підходящих методик визначення, показників якості та/або їх нормування.*

## КУРКУМА ЯВАНСЬКА

*Curcumae xanthorrhizae rhizoma*

## TURMERIC, JAVANESE

Висушені, розрізані на тонкі шматочки кореневища *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (*C. xanthorrhiza* D. Dietrich).

## Вміст:

- ефірної олії: не менше 50 мл/кг, у перерахунку на безводну сировину;
- похідних дицинамоїлметану: не менше 1.0 %, у перерахунку на куркумін ( $C_{21}H_{20}O_6$ ; М.м. 368.4) і безводну сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має ароматний запах.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Сировина складається зі шматочків оранжево-жовтого або жовтаво-коричневого, або сірувато-коричневого кольору, переважно очишених, від 1.5 мм до 6 мм завтовшки та від 15 мм до 50 мм, іноді до 70 мм, у діаметрі. Зрідка наявні фрагменти корка коричнювато-сірого кольору. Поперечний зріз жовтого кольору із темними плямами у світлішій серцевині. Злам рівний, дрібнозернистий.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: фрагменти безбарвної паренхіми із секреторними клітинами оранжево-жовтого або жовтаво-коричневого кольору; фрагменти сітчастих та інших судин; зрідка фрагменти корка й епідерми та фрагменти товстостінних одноклітинних гострих волосків. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину Р. У порошку виявляються численні, багаточислові крохмальні зерна, яйцеподібної або неправильної форми, близько від 30 мкм до 50 мкм завдовжки та від 10 мкм до 30 мкм завширшки, із ексцентричним центром крохмалеутворення та помітною концентричною шаруватістю.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27), як зазначено у випробуванні *Curcuma domestica* із такими змінами.

Виявлення: пластинку обприскують свіжоприготованим розчином 0.4 г/л дихлорхінонхлоріміду Р у 2-пропанолі Р. пластинку витримують у парі аміаку до забарвлення зони тимолу у синювато-фіолетовий колір.

Результати: на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: майже у середній частині – синювато-фіолетова зона (тимол), у нижній частині – жовта зона (флуоресцеїн). На хроматограмі випробуваного розчину мають виявлятися: синя зона (ксанторизол) дещо вище зони тимолу на хроматограмі розчину порівняння та дві зони жовтаво-коричневого або коричневого кольору (куркумін і деметоксикуркумін) між зонами, відповідними тимолу та флуоресцеїну на хроматограмі розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Curcuma domestica*. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 0.5 г свіжоздрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) струшують із 5 мл метанолу Р протягом 30 хв і фільтрують.

Розчин порівняння. 5 мг флуоресцеїну Р і 10 мг тимолу Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: кислота оцтова льодяна Р - толуол Р (20:80).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують сумішшю кислота сірчана Р - оцтовий ангідрид Р (1:9) і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі випробуваного розчину не має виявлятися зона жовтаво-червоної флуоресценції (бісдеметоксикуркумін) дещо вище зони зеленувато-синьої флуоресценції, відповідної флуоресцеїну на хроматограмі розчину порівняння.

Вода (2.2.13). Не більше 120 мл/кг. Визначення проводять методом дистиляції, використовуючи 20.0 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12).

Загальна зола (2.4.16). Не більше 8.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Ефірна олія. Визначення проводять як зазначено у статті (2.8.12). Використовують круглодонну колбу місткістю 500 мл, 200 мл води Р як дистиляційну рідину та 0.5 мл ксилолу Р у градуйованій трубці. Сировину подрібнюють на порошок (500) (2.9.12) і 5.0 г відразу використовують для визначення. Дистиляцію проводять зі швидкістю від 3 мл/хв до 4 мл/хв протягом 3 год.

Похідні дицинамоїлметану. До 0.100 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) додають 60 мл кис-

люти оцтової льодяної *P* і нагрівають у водяній бані при температурі 90 °С протягом 60 хв. Додають 2.0 г кислоти борної *P* і 2.0 г кислоти щавлевої *P* і нагрівають у водяній бані при температурі 90 °С протягом 10 хв. Охолоджують, доводять кислотою оцтовою льодяною *P* до об'єму 100.0 мл і струшують. 5.0 мл прозорої надосадової рідини доводять кислотою оцтовою льодяною *P* до об'єму 50.0 мл. Вимірюють оптичну густину (2.2.25) одержаного розчину за довжини хвилі 530 нм, використовуючи як компенсаційну рідину кислоту оцтову льодяну *P*.

Вміст похідних дицинамоїлметану, у перерахунку на куркумін, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 0.426}{m}$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 530 нм,

*m* — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання, що дорівнює 2350.

## ЛАМІНАРІЇ СЛАНІ<sup>N</sup>

### Laminariae thalli

Цілі або різані, висушені пластини сланей без «стовбурців» бурих морських водоростей *Laminaria japonica* Agesch. або *Laminaria saccharina* (L.) Lam., зібрані у період від червня до жовтня.

**Вміст:**

— загальний йод (А.м. 126.9): не менше 0.1 %, у перерахунку на суху сировину;

— полісахариди: не менше 8 %, у перерахунку на суху сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має солонуватий смак.

Сировина має своєрідний запах.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Цільна сировина складається із щільних, шкірястих пластин сланей із хвилястими краями, від світло-оливкового до темно-оливкового, зеленувато-коричневого, червонувато-коричневого, деколи зеленувато-чорного кольору, зовні вкритих білим нальотом солей.

Різана сировина складається із смуг сланей від 0.2 см до 0.4 см завширшки та не менше 0.03 см завтовшки.

Слані *Laminaria japonica* — стрічкоподібні пластини, складені вздовж, із цільними краями або шматки пластин не менше 15 см завдовжки, не менше 7 см завширшки та не менше 0.03 см завтовшки.

Слані *Laminaria saccharina* — зморшкуваті, листо-подібні пластини або їх шматки не менше 10 см завдовжки, не менше 5 см завширшки та не менше 0.03 см завтовшки.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок зеленувато-коричневого, червонувато-коричневого або зеленувато-чорного кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошок виявляються: фрагменти поверхневих шарів слані із дрібних, майже квадратних, забарвлених клітин із товстими, прямими або рідше слабо хвилястими оболонками; фрагменти слані із крупних, безбарвних, паренхімних клітин; фрагменти слані із округлими вмістищами слизу; фрагменти серцевинної частини слані із дуже видовжених, переплетених, товстостінних клітин.

**С.** До 1 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 20 мл 2 % (об/об) розчину кислоти хлористоводневої *P*, енергійно струшують, фільтрують, промивають осад 10 мл води *P* і фільтрують. До осаду додають 10 мл розчину 200 г/л натрію карбонату *P*, струшують і центрифугують, збирають надосадову рідину, доводять рН до 1.5 кислотою сірчаною *P*; повільно формується білий, пластівцевий осад.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 10.0 % сланей із пожовтілими краями; не більше 0.5 % мінеральної домішки (ракушки, камінці); не більше 15.0 % сланей завтовшки менше 0.03 см.

**Арсен (2.4.27).** Не більше 0.009 % (90 ppm).

**Кадмій (2.4.27).** Не більше 0.0004 % (4 ppm).

**Свинець (2.4.27).** Не більше 0.0005 % (5 ppm).

**Ртуть (2.4.27).** Не більше 0.00001 % (0.1 ppm).

**Показник набухання (2.8.4).** Не менше 10.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 15.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 40.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 2.0 %.



## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**ЗАГАЛЬНИЙ ЙОД.** 1.000 г здрібноної на порошок сировини поміщають у високий фарфоровий тигель, додають 5 мл *води Р* і 5.0 г *калію гідроксиду Р*, перемішують магнієвою паличкою, нагрівають на водяній бані та додають 1.0 г *калію карбонату Р*. Перемішують, додають кінець магнієвої палички із залишком сировини та висушують, спочатку на водяній бані, потім на відкритому полум'ї. Одержаний залишок спалюють, поступово підвищуючи температуру, але не перевищуючи 600 °С, охолоджують, додають 20 мл *води Р* і обережно нагрівають до кипіння при перемішуванні склянкою паличкою. Отриману гарячу суміш фільтрують крізь нескладчастий фільтр у конічну колбу. Залишок промивають 4 порціями, по 20 мл кожна, гарячої *води Р*. Фільтр і тигель промивають 50 мл гарячої *води Р*. Промивні води об'єднують, охолоджують і нейтралізують *кислотою сірчаною розведеною Р* у присутності *розчину метилового оранжевого Р*. Додають 3 мл *кислоти сірчаної розведеної Р* і 1 мл *бромної води Р*; розчин жовтий. Через 5 хв додають 0.6 мл розчину 50 г/л *фенолу Р*; розчин прозорий. Отриманий розчин підкислюють 5 мл *кислоти фосфорної Р*, додають 0.2 г *калію йодиду Р*, витримують у захищеному від світла місці протягом 5 хв і титрують 0.01 *М розчином натрію тіосульфату*, використовуючи як індикатор 1 мл *розчину крохмалю Р*.

1 мл 0.01 *М розчину натрію тіосульфату* відповідає 0.2115 мг йоду.

**ПОЛІСАХАРИДИ.** Близько 10.0 г (точна наважка) здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у колбу зі шліфом місткістю 250 мл, додають 100 мл *води Р*, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв і декантують у мірну колбу місткістю 250 мл крізь 5 шарів марлі, попередньо змоченої *водою Р*. Екстрагування продовжують 3 порціями, по 100 мл кожна, *води Р*, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Кожний витяг охолоджують, центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв і декантують у ту саму колбу. Фільтр промивають 10 мл 96 % *спирту Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки.

25 мл одержаного розчину поміщають у центрифужну пробірку, додають 50 мл 96 % *спирту Р*, перемішують, нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрують під вакуумом за залишкового тиску від 15 кПа до 16 кПа крізь скляний фільтр ПОР-16, попередньо висушений при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші *вода Р - 96 % спирт Р* (1:2) і промивають 10 мл 96 % *спирту Р*. Фільтр із осадом сушать на повітрі, потім висушують до постійної маси при температурі від 100 °С до 105 °С.

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

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

де:

*m* — маса наважки сировини, у грамах;

*m*<sub>1</sub> — маса фільтра, у грамах;

*m*<sub>2</sub> — маса фільтра із залишком, у грамах;

*W* — втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

МАТЕРИНКИ ТРАВА<sup>N</sup>

## Origanum vulgare herba

Ціла або різана, висушена трава *Origanum vulgare L.*, зібрана у фазу цвітіння.

**Вміст:**

*ціла сировина:*

— *ефірна олія*: ▼ не менше 1 мл/кг, у перерахунку на суху сировину ▲;

*різана сировина:*

— *ефірна олія*: ▼ не менше 0.8 мл/кг, у перерахунку на суху сировину ▲.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Цілі або частково здрібнені, олистяні квітконосні пагони із чотиригранними зеленими або пурпуровими, м'яко опушеними або майже голими стеблами до 20 см завдовжки. Листки від 20 мм до 40 мм завдовжки, супротивні, із опушеними черешками та довгасто-яйцеподібною пластинкою із дрібнозубчастим або майже цільним краєм і загостреною або тупою верхівкою. Квітки у пазушних півзонтиках, зібраних у розлогі, багатоквіткові, щиткоподібні волоті. Приквітки довші за чашечку, довгасті або обернено-яйцеподібно-еліптичні, гострі, зеленувато-пурпурні або темно-пурпурні. Чашечка не відрізняється за забарвленням від приквітків, дзвоникувата, із трикутно-ланцетоподібними зубцями, гола або із рідкими волосками. Віночок двогубий, від коричнювато-пурпурового до коричнювато-рожевого кольору, від 3 мм до 6 мм завдовжки, його трубка дещо довша за чашечку.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок від зеленого до сірувато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *розчин хлоральгідрату Р*. У порошок виявляються: численні грубо бородавчасті покривні волоски, що складаються із від 1 до 7 клітин, що містять призматичні кристали кальцію оксалату; фрагменти верхньої епідерми із клітин зі слабо звивистими

оболонками; фрагменти нижньої епідерми із клітин із більш звивистими оболонками та численних продигових апаратів діацитного типу (2.8.3); фрагменти пластинки листка із характерними для *Lamiaceae* δ-клітинними ефіроолійними залозками із розеткою клітин епідерми у місці їх прикріплення; залозисті волоски із одноклітинною ніжкою та овальною одноклітинною голівкою; кулясті пилкові зерна із гладенькою екзиною.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5 мл метиленхлориду *P*, струшують протягом 3 хв і фільтрують над 2 г натрію сульфату безводного *P*.

**Розчин порівняння.** 1 мг тимолу *P* розчиняють у 10 мл метиленхлориду *P*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силикагелю *P*.

**Рухома фаза:** метиленхлорид *P*.

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином анісового альдегіду *P*, використовуючи 10 мл на пластинку площею 200 мм<sup>2</sup>, і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
тимол: рожева зона	фіолетова зона
	інтенсивна фіолетова або коричнево-фіолетова зона
	рожево-фіолетова зона
	слаба синьо-фіолетова зона синьо-фіолетова зона
	сіра або світло-зелена зона інтенсивна коричнево-фіолетова зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 7 % почорнілих і побурілих частин рослини; не більше 40 % шматочків стебел і бічних гілочок, у тому числі відді-

лених при аналізі; не більше 2 % сторонніх часток, у тому числі не більше 1 % домішок мінерального походження.

► **Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 13.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.▲

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 15.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 4.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Ефірна олія (2.8.12).** Використовують 30.0 г сировини, круглодонну колбу місткістю 1000 мл і 400 мл води *P* як дистиляційну рідину. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 2 год без ксилолу *P* у градуйованій трубі.

## МИРРА

### Myrrha

## MYRRH

Смола, затверділа на повітрі, одержана із надрізу, або виробляється як природне виділення зі стовбура та гілок *Commiphora molmol* Engler та/або інших видів *Commiphora*.

## ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має гіркий смак.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Гранули або шматочки компонентів світло- або темно-оранжево-коричневого кольору, неправильної або округлої форми, різні за розміром і забарвленням. Поверхня їх, звичайно, вкрита сірим або жовтаво-коричневим пилом.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок коричневатого-жовтого або червоно-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошку виявляються: дрібні фрагменти тканин вихідних рослин; фрагменти червоно-коричневого корка; поодинокі або у групах кам'янисті клітини, багатогранні або видовженої форми, із частково

## Мирри настойка

дуже потовщеними, пористими, лігніфікованими оболонками та коричнюватим вмістом; фрагменти тонкостінної паренхіми та склеренхімних волокон; неправильної призматичної форми або багатогранні кристали кальцію оксалату розміром близько від 10 мкм до 25 мкм.

**С.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні *Commiphora mukul*.

**Виявлення:** обприскують розчином анісового альдегіду *P* і переглядають при денному світлі, при нагріванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння у нижній третині має виявлятися оранжево-коричнева зона (тимол), у середній третині — фіолетова зона (анетол). На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися інтенсивна фіолетова зона (фураноеудесма-1,3-дієн), що перевищує інші зони за величиною й інтенсивністю та розташована вище зони анетолу на хроматограмі розчину порівняння; фіолетова зона на рівні зони анетолу на хроматограмі розчину порівняння; 2 інтенсивні фіолетові зони на рівні зони тимолу на хроматограмі розчину порівняння, верхня відповідає курзеренону, нижня — 2-метоксифуранодієну. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші переважно фіолетові зони.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Commiphora mukul.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5.0 мл 96 % спирту *P*, одержану суміш нагрівають на водяній бані протягом від 2 хв до 3 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 10 мг тимолу *P* і 40 мкл анетолу *P* розчиняють у 10 мл 96 % спирту *P*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** етилацетат *P* - толуол *P* (2:98).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** у нижній третині хроматограми випробовуваного розчину не мають виявлятися синя або фіолетова зони.

**Речовини, не розчинні у 96 % спирті.** Не більше 70 %.

1.00 г здрібненої на порошок сировини (250) (2.9.12) поміщають у колбу, додають 30 мл 96 % спирту *P*,

енергійно струшують протягом 10 хв, надосадову рідину фільтрують крізь попередньо зважений скляний фільтр (16) (2.1.2), уникаючи переносу осаду із колби. Повторюють екстракцію 2 порціями, по 20 мл кожна, 96 % спирту *P*. Осад кількісно переносять на фільтр, промиваючи колбу 96 % спиртом *P*, висушують фільтр і осад при температурі від 100 °С до 105 °С і зважують.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 15.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 7.0 %.

## МИРРИ НАСТОЙКА

### Myrrhae tinctura

#### MYRRH TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Мирра».

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини та 5 частин спирту (90 % об/об) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис:** Прозора рідина жовтаво-коричневого або оранжево-коричневого кольору.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 5 мл настойки доводять 96 % спиртом *P* до об'єму 10 мл.

**Розчин порівняння.** 10 мг тимолу *P* і 40 мкл анетолу *P* розчиняють у 10 мл 96 % спирту *P*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** етилацетат *P* - толуол *P* (2:98).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином анісового альдегіду *P* і переглядають при денному світлі при нагріванні

ванні при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші, переважно фіолетові, зони.

Верхня частина пластинки	
	інтенсивна фіолетова зона, що за розміром і забарвленням перевищує інші зони (фураноеудесма-1,3-дієн)
анетол: фіолетова зона	фіолетова зона
тимол: оранжево-червона зона	дві інтенсивні фіолетові зони (курзеренон і нижче 2-метоксифуранодієн)
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ВИПРОБУВАННЯ

**Етанол (2.9.10).** Від 82 % (об/об) до 88 % (об/об).

**Метанол і 2-пропанол (2.9.11).** Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

**Сухий залишок (2.8.16).** Не менше 4.0 % (м/м).

## ЗБЕРІГАННЯ

Не рекомендується зберігати настоянку у пластиковому контейнері.

# МУЧНИЦІ ЛИСТЯ

## *Uvae ursi folium*

### BEARBERRY LEAF

Цілі або різані, висушені листки *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.

**Вміст:** не менше 7.0 % арбутину безводного (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>; М.м. 272.3), у перерахунку на суху сировину.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Пластинка листка звичайно від 7 мм до 30 мм завдовжки та від 5 мм до 12 мм завширшки, на адаксіальній поверхні блискуча і темно-зелена, на абак-

сіальній поверхні світліша. Ціла пластинка листка, оберненоїцеподібна із цільними, дещо загорнутими донизу краями, звужена до основи у короткий черешок. Пластинка листка із притупленою або дещо виїмчастою верхівкою. Пластинка товста та шкіряста. Жилкування перисте та тонко сітчасте, чітко видиме на обох поверхнях. Адаксіальна поверхня із помітно вдавленими жилочками, що надає їй характерного зернистого вигляду. Лише молоді листки мають війчасті краї. Старі листки голі.

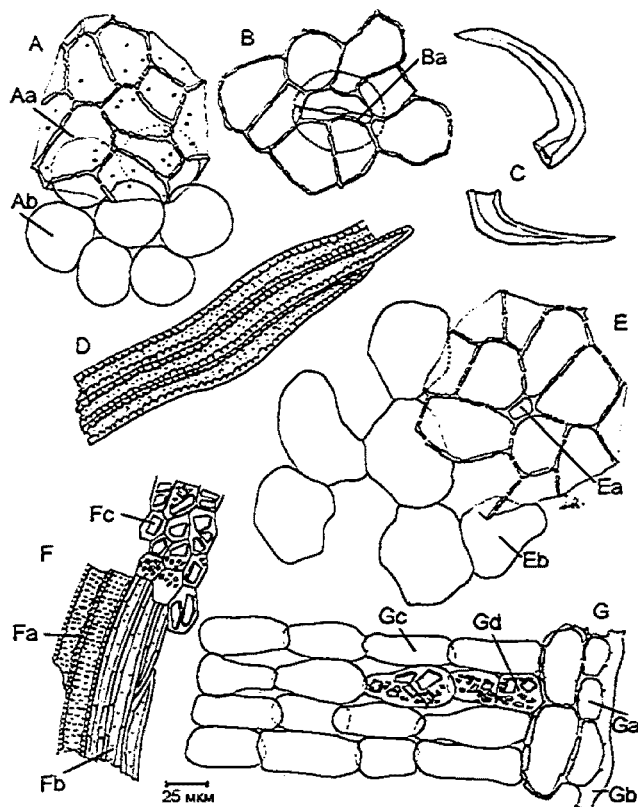


Рисунок 1054.-1. — Діагностичні структури мучниці листків (Ідентифікація В)

**В.** Мікроскопічне дослідження (2.8.23). Порошок зеленого, зеленувато-сірого або жовтаво-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошок виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1054.-1): фрагменти адаксіальної епідерми — вигляд із поверхні [А] із багатокутних клітин із товстими, безладно пористими оболонками [Аа], звичайно із прилеглою палісадною паренхімою [Аb]; фрагменти адаксіальної епідерми на поперечному зрізі [G] із клітин із прямими оболонками [Ga], вкритих товстою гладенькою кутикулою [Gb] та прилеглою палісадною паренхімою [Gc] із 3 або 4 шарів клітин різної довжини, деякі із них містять численні призми оксалату кальцію [Gd]; фрагменти абаксіальної епідерми — вигляд із поверхні [B, E] із продишовими апаратами аномоцитного типу (2.8.3) [Ba], оточеними 5-11 побічними клітинами [B], рубцями від основ волосків [Ea] і прилеглою губчастою паренхімою [Eb]; групи здерев'янілих волокон перициклічного походження [D]; фрагменти провідного пучка [F] із пористих судин [Fa] і волокон [Fb], які супроводжу-

## Мучниці листя

ються рядами клітин із призмами кальцію оксалату [Fc]; крапельки одії у клітинах паренхіми; зрідка фрагменти конічних, одноклітинних покривних волосків [C].

### С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і води Р і нагрівають зі зворотним холодильником протягом 10 хв. Одержаний гарячий розчин фільтрують, колбу та фільтр обполіскують сумішшю рівних об'ємів метанолу Р і води Р і доводять тією самою сумішшю розчинників до об'єму 5 мл.

**Розчин порівняння.** 25 мг арбутину Р, 25 мг кислоти галової Р та 25 мг гідрохінону Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину до 10.0 мл тим самим розчином.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - вода Р - етилацетат Р (6:6:88).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл розчину порівняння і 20 мкл випробовуваного розчину, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** близько 15 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 105 °С до 110 °С до видалення розчинників (рухомої фази).

**Виявлення:** обприскують розчином 10 г/л дихлорхінонхлоріміду Р у метанолі Р, потім розчином 20 г/л натрію карбонату безводного Р.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також 2 або 3 блакитні смуги та декілька коричневих або коричнюватосірих смуг.

Верхня частина пластинки	
гідрохінон: блакитна зона	блакитна зона
кислота галова: коричнювата зона	коричнювата зона
арбутин: світло-блакитна зона	світло-блакитна зона (арбутин)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки.** (2.8.2). Не більше 5 % стебел; не більше 3 % інших сторонніх домішок.

**Листки іншого кольору.** Не більше 10 %, визначення проводять як зазначено в (2.8.2).

**Втрата в масі при висушуванні** (2.2.32). Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола** (2.4.16). Не більше 5.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

### Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** 0.800 г здрібненої на порошок сировини (250) (2.9.12) поміщають у колбу із притертою пробкою місткістю 100 мл, додають 20 мл води Р, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують крізь тампон із вати. Тампон із вати додають до залишку у колбу місткістю 100 мл і екстрагують 20 мл води Р на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Об'єднані фільтрати доводять водою Р до об'єму 50.0 мл, фільтрують крізь паперовий фільтр, перші 10 мл фільтрату відкидають.

**Розчин порівняння (а).** 50.0 мг ФСЗ арбутину розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл.

**Розчин порівняння (б).** 2.5 мг гідрохінону Р розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл. До 5.0 мл цього розчину додають 2.5 мл розчину порівняння (а) і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний, деактивований відносно основ, для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:** метанол Р - вода Р (10:90).

**Швидкість рухомої фази:** 1.2 мл/хв.

**Детектування:** спекрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

**Об'єм інжекції:** 20 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:**

— коефіцієнт розділення: не менше 4.0 для піків арбутину та гідрохінону на хроматограмі розчину порівняння (б).

Вміст арбутину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p}{F_2 \times m_1}$$

де:

$F_1$  — площа піка арбутину на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_2$  — площа піка арбутину на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса наважки сировини, взятої для приготування випробовуваного розчину, у грамах;  
 $m_2$  — маса наважки ФСЗ арбутину, взятого для приготування розчину порівняння, у грамах;  
 $p$  — вміст арбутину у ФСЗ арбутину, у відсотках.

$m_0$  — маса наважки ФСЗ ДФУ арбутину, у грамах,  
 $P$  — вміст арбутину безводного у ФСЗ ДФУ арбутину, у відсотках,  
 $m$  — маса наважки сировини, у грамах.

N

Допускається кількісне визначення проводити за наведеною нижче методикою.

Вміст: не менше 7.0 % гідрокінон-похідних, у перерахунку на арбутин безводний ( $C_{12}H_{16}O_7$ ; М.м. 272.3) і суху сировину.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Вихідний розчин.** До 0.4 г здрібненої на порошок сировини (250) (2.9.12) додають 50 мл води Р і кип'ятять у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Після охолодження суміш за допомогою 50 мл води Р кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 мл, доводять водою Р до позначки та перемішують. Витримують до осадження частинок і використовують надосадову рідину.

**Випробовуваний розчин.** 5.0 мл вихідного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 45 мл води Р, 1 мл розчину 2 % (м/об) амінопіразолону Р, 0.5 мл аміаку розчину розведеного Р2 та 1 мл розчину 8 % (м/об) калію фероціаніду Р, ретельно перемішуючи після кожного додавання. Витримують протягом 5 хв, одержаний водний шар струшують не менше як із 3 порціями, по 25 мл кожна, хлороформу Р, хлороформний шар кожний раз фільтрують крізь попередньо промитий хлороформом Р фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину хлороформом Р до позначки та перемішують.

**Розчин порівняння.** 0.015 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ арбутину розчиняють у 50 мл води Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку та далі вчиняють, як описано при приготуванні випробовуваного розчину, починаючи зі слів «...та додають 45 мл води Р...».

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм, використовуючи як компенсаційну рідину хлороформ Р. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння.

Вміст гідрокінон-похідних, у перерахунку на арбутин, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times m_0 \times 2.5 \times P}{A_0 \times m}$$

де:

$A$  — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм,

$A_0$  — оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 455 нм,

## НАГІДОК КВІТКИ

### Calendulae flos

#### CALENDULA FLOWER

Цілі або різані, висушені, повністю розкриті квітки, без ложа кошика, махрових форм *Calendula officinalis* L., що культивуються.

Вміст: не менше 0.4 % флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ , М.м. 464.4) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Несправжньоаязичкові квітки складаються із жовтого або оранжево-жовтого відгину віночка від 3 мм до 5 мм завширшки і близько 7 мм у середній частині, із тризубчастою верхівкою, опушеної, майже серпоподібної трубки віночка жовтаво-коричневого або оранжево-коричневого кольору та маточки із виступаючим стовпчиком, дволопатевою приймочкою та, зрідка, із дещо зігнутою зав'яззю від жовтаво-коричневого до оранжево-коричневого кольору. Трубочасті квітки близько 5 мм завдовжки наявні, вони складаються із жовтого, оранжево-червоного або червонувато-фіолетового п'ятилопатевого відгину віночка, жовтаво-коричневої або оранжево-коричневої, опушеної в нижній частині трубки віночка, та, звичайно, із дещо зігнутої зав'язі жовтаво-коричневого або оранжево-коричневого кольору.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355). Порошок жовтаво-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1297.-1): фрагменти епідерми віночка [С, F, K], що містять світло-жовті краплі олії; деякі фрагменти з досить великими продиховими апаратами аномоцитного типу (2.8.3) [Fa, Ka]; покривні волоски дворядні, багатоклітинні, конічні, звичайно фрагментовані [G]; залозисті волоски із багатоклітинною нішкою [E]; численні ефіроолійні залозки біля основи віночка [D]; фрагменти віночка [B] із паренхімних клітин, що містять призми та дуже дрібні друзи кальцію оксалату [Ba, Da], та дрібних судин [Bb]; кулясті пилкові зерна близько 40 мкм у діаметрі, із гостро шипуватою екзиною та трьома проростковими порами [A, J]; рідко трапляються фрагменти приймочок із короткими цибулиноподібними сосочками [H].

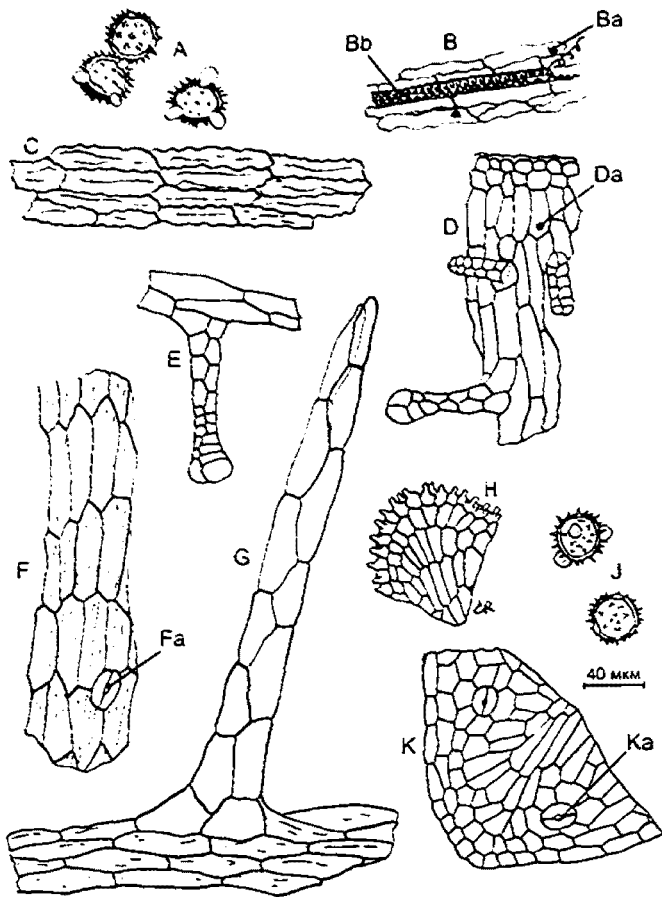


Рисунок 1297.-1. Діагностичні структури нагідок квіток (Ідентифікація В)▲

**С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).**

**Випробовуваний розчин.** 1.0 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) змішують із 10 мл метанолу Р, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 1.0 мг кислоти кофейної Р, 1.0 мг кислоти хлорогенової Р і 2.5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - вода Р - етилацетат Р (10:10:80).

**Об'єм проб, що наносяться:** 20 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 ° до 105 °С.

**Виявлення:** теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогалу 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині — жовтаво-коричнева флуоресціююча зона (рутин), у середній частині — блакитна флуоресціююча зона (кислота

хлорогенова), у верхній частині — блакитна флуоресціююча зона (кислота кофейна). На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися жовтаво-коричнева флуоресціююча зона на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; нижче та безпосередньо вище неї мають виявлятися жовтаво-зелена флуоресціююча зона та блакитна флуоресціююча зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище неї — жовтаво-зелена флуоресціююча зона та блакитна флуоресціююча зона дещо нижче зони, що відповідає кислоті кофейній на хроматограмі розчину порівняння. ▽ На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони. ▲

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5 % приквіткові і не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Вихідний розчин.** 0.800 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л гексаметилентетраміну Р, 7 мл кислоти хлористоводневої Р1 і 20 мл ацетону Р. Одержану суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв і фільтрують крізь тампон із вати у мірну колбу місткістю 100 мл. Додають тампон із вати до залишку у круглодонну колбу та екстрагують двома порціями, по 20 мл кожна, ацетону Р, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, і охолоджують до кімнатної температури. Одержану рідину фільтрують крізь тампон із вати, потім об'єднаний ацетоновий розчин фільтрують крізь фільтрувальний папір у мірну колбу та доводять об'єм розчину ацетоном Р до 100.0 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 20 мл води Р й екстрагують однією порцією 15 мл, а потім трьома порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р. Об'єднані етилацетатні екстракти поміщають у ділильну лійку, промивають двома порціями, по 50 мл кожна, води Р, фільтрують над 10 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину етилацетатом Р до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл реактиву алюмінію хлориду Р1 доводять об'єм розчину розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р до 25.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної *P* у метанолі *P* до об'єму 25.0 мл.

Оптичну густина (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 425 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст флавоноїдів, у відсотках, у перерахунку на гіперозид, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1.25}{m}$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм,

*m* — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання гіперозиду, що дорівнює 500.

**N**

Допускається використання також суцвіть — кошиків, а також кошиків немахрових форм *Calendula officinalis* L., що культивуються.

При цьому сировина має витримувати наведені вище вимоги із такими змінами та доповненнями.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Цілі або ті, що частково обсіпалися, кошики до 5 см у діаметрі, без квітконосів або із залишками квітконосів не більше 3 см завдовжки. Обгортка сіро-зелена, одно- дворядна, із лінійних, загострених, густо опушених листочків. Ложе кошика дещо опукле, голе. Крайові квітки несправжньоаязичкові, червонувато-оранжевого, оранжевого, яскраво- або блідо-жовтого кольору, 15–28 мм завдовжки, 3–5 мм завширшки, розташовані у 2–3 ряди у немахрових форм та у 10–15 рядів у махрових форм. Віночок несправжньоаязичкових квіток має зігнуту, коротку, опушену трубку та тризубчастий, із 4–5 жилками відгин, який удвічі довший за обгортку. Маточка цих квіток із зігнутою нижньою одногніздою зав'яззю, тонким стовпчиком і дволопатевою приймочкою. Середні квітки трубчасті з п'ятизубчастим віночком, оранжевого, жовтаво-коричневого або жовтого кольору.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок жовтаво-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошок виявляються: фрагменти епідерми несправжньоаязичкових або трубчастих квіток із видовжених, вкритих складчастою кутикулою клітин із оранжевими хромопластами; фрагменти епідерми листочків обгортки із видовжених клітин із прямими або звивистими оболонками та

продихових апаратів аномічного типу (2.8.3); покривні волоски несправжньоаязичкових або трубчастих квіток багатоклітинні, одно- дворядні; покривні волоски листочків обгортки довгі, одно- дворядні; залозисті волоски одно- дворядні з голівкою із 2 або 4 клітин; ефіроолійні залозки із багатоклітинною дворядною ніжкою та великою яйцеподібною дворядною багатоклітинною голівкою; пилкові зерна округлі, із шипуватою екзиною.

▼ **D.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібноної на порошок сировини (500) (2.9.12) додають 20 мл 50 % спирту *P*, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, фільтрують, фільтрат випарюють за залишкового тиску до об'єму близько 5 мл, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 5.0 мл води *P* та змивають 5.0 мл метанолу *P*. Використовують одержаний метанольний фільтрат.

**Розчин порівняння.** До 5.0 мг ФСЗДФУ календулозидів додають 5 мл метанолу *P*, перемішують, витримують і використовують надосадову рідину.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** хлороформ *P* – кислота оцтова льодяна *P* – метанол *P* – вода *P* (35:16:6:4).

**Об'єм проб, що наносяться:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 10 хв.

**Виявлення:** пластинку обприскують розчином анісового альдегіду *P*, витримують протягом 10 хв в сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С і переглядають при денному світлі.

**Результати:** на хроматограмі розчину порівняння у середній частині пластинки мають виявлятися дві основні чітко розділені зони синьо-фіолетового кольору. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися не менше двох чітко розділених зон синьо-фіолетового кольору на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину порівняння (календулозиди). ▲

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 6 % залишків квітконосів, у тому числі відділених при аналізі; не більше 20 % кошиків без квіток (ложе кошиків із обгортками); не більше 3 % побурілих кошиків; не більше 3 % інших частин рослини (шматочків стебел і листків); не більше 1 % сторонніх часток, не більше 0.5 % домішок мінерального походження.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 14 %. 1.000 г здрібноної на порошок сировини (500) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 11.0 %.



НАГІДОК НАСТОЙКА<sup>N</sup>

## Calendulae tinctura

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Нагідок квітки».

*Вміст:* не менше 0.04 % флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, М.м. 464.4).

## ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини та 10 частин спирту (від 60 % об/об до 70 % об/об) підходящим методом.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Рідина жовтаво-коричневого кольору.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Випробовувана настойка.

*Розчин порівняння.* 1.0 мг кислоти кофеїної Р, 1.0 мг кислоти хлорогенової Р і 2.5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* кислота мурашина безводна Р - вода Р - етилацетат Р (10:10:80).

*Об'єм проби, що наноситься:* 25 мкл випробовуваного розчину, 20 мкл розчину порівняння, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* при температурі від 100 °С до 105 °С.

*Виявлення:* теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

*Результати:* на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині — жовтаво-коричнева флуоресціююча зона (рутин), у середній частині — блакитна флуоресціююча зона (кислота хлорогенова), у верхній частині — блакитна флуоресціююча зона (кислота кофеїна).

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися жовтаво-коричнева флуоресціююча зона на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; нижче та безпосередньо вище неї мають виявлятися жовтаво-зелена флуоресціююча зона та блакитна флуоресціююча зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище неї — жовтаво-коричнева флу-

оресціююча зона та блакитна флуоресціююча зона дещо нижче зони, що відповідає кислоті кофеїній на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

**В.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 25 мл настойки випарюють на водяній бані до об'єму близько 5 мл, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 5.0 мл води Р та змивають 5.0 мл метанолу Р. Використовують одержаний метанольний фільтрат.

*Розчин порівняння.* До 5.0 мг ФСЗДФУ календулозидів додають 5 мл метанолу Р, перемішують, витримують і використовують надосадову рідину.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (5-40 мкм).

*Рухома фаза:* хлороформ Р - кислота оцтова льодяна Р - метанол Р - вода Р (35:16:6:4).

*Об'єм проби, що наноситься:* 20 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі протягом 10 хв.

*Виявлення:* пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р, витримують протягом 10 хв у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С і переглядають при денному світлі.

*Результати:* на хроматограмі розчину порівняння у середній частині мають виявлятися дві основні чітко розділені зони синьо-фіолетового кольору. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися не менше двох чітко розділених зон синьо-фіолетового кольору на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину порівняння (календулозиди).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Arnica montana L.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Ідентифікація А». На хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися інтенсивна зеленувато-жовта флуоресціююча зона астрагаліну, розташована дещо вище зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння.

**Етанол (2.9.10).** Від 64 % (об/об) до 69 % (об/об).

**Сухий залишок (2.8.16).** Не менше 2 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

*Вихідний розчин.* 5.00 г настойки поміщають у колбу місткістю 100 мл і випарюють на водяній бані до

майже сухого залишку. До залишку додають 0.5 мл розчину 5 г/л гексаметилентетраміну Р, 15 мл ацетону Р, 1 мл кислоти хлористоводневої Р1. Одержану суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 50 мл. Колбу місткістю 100 мл промивають 15 мл ацетону Р, промивну рідину фільтрують крізь той самий фільтр у ту саму мірну колбу, доводять об'єм розчину ацетоном Р до 50.0 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр, і перемішують. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 20 мл води Р і екстрагують однією порцією 15 мл, а потім із трьома порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р. Об'єднані етилацетатні витяги поміщають у ділильну лійку, промивають двома порціями, по 50 мл кожна, води Р, фільтрують над 10 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину етилацетатом Р до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл реактиву алюмінію хлориду Р1 доводять об'єм розчину розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р до 25.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (об/об) кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р до об'єму 25.0 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 425 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст суми флавоноїдів, у відсотках, у перерахунку на гіперозид, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 0.625}{m}$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм,

*m* — маса наважки настойки, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання гіперозиду, що дорівнює 500.

## НАПЕРСТЯНКИ ЛИСТЯ

### Digitalis purpureae folium

#### DIGITALIS LEAF

Висушені листки *Digitalis purpurea* L.

**Вміст:** не менше 0.3 % серцевих глікозидів, у перерахунку на дігітоксин (М.м. 765) і суху сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має слабкий, але характерний запах.

Цілий листок близько від 10 см до 40 см завдовжки та від 4 см до 15 см завширшки. Пластинка від яйцеподібно-ланцетної до широко-яйцеподібно-ланцетної форми. Черешок крилатий, від 1/4 довжини пластинки до майже однакової з нею довжини.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Листок крихкий, часто поламаний. Верхня поверхня зелена, нижня — сірувато-зелена. Верхівка майже гостра, край нерівномірно городчастий, зубчастий або пилчастий. Основа збіжна. Жилкування перисте, бічні жилки виступають переважно на нижній поверхні, відходять від середньої жилки під кутом 45° і з'єднуються близько краю; кінчики жилок заходять у кожен зубчик краю, нижні жилки спускаються донизу у крилатий черешок. Верхня поверхня зморшкувата та опушена; нижня поверхня із виступаючою сіткою жилок і густо опушена.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошок виявляються: клітини епідерми із прямими або дещо звивистими на верхній поверхні та помітно звивистими на нижній поверхні антиклінальними оболонками; кутикула гладенька. Волоски 2 типів: однорядні, пригуплено загострені покривні волоски, звичайно із 3–5 клітин, із яких 1 або більше часто спалі, стінки їх переважно тонко бородавчасті та дещо штрихуваті; залозисті волоски із одноклітинною, зрідка багатоклітинною, однорядною ніжкою та одноклітинною або двоклітинною, або, як виняток, чотириклітинною голівкою. Продихові апарати аномоцитного типу (2.8.3) відсутні або трапляються дуже рідко на верхній поверхні, на нижній поверхні вони численні. Кристали кальцію оксалату та склеренхіма відсутні.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) додають суміш 20 мл спирту (50 % об/об) Р і 10 мл розчину свинцю(II) ацетату Р. Кип'ятять протягом 2 хв, охолоджують і центрифугують. Надосадовий розчин струшують із 2 порціями, по 15 мл кожна, хлороформу Р, відокремлюють 2 шари центрифугуванням, якщо необхідно. Висушують хлороформні шари над натрію сульфатом безводним Р1 фільтрують. 10 мл одержаного розчину упарюють насухо на водяній бані та одержаний залишок розчиняють в 1 мл суміші рівних об'ємів хлороформу Р і метанолу Р.

**Розчин порівняння.** 5 мг ФСЗ пурпуреаглікозиду А, 2 мг ФСЗ пурпуреаглікозиду В, 5 мг дігітоксину Р і 2 мг гітоксину Р розчиняють у суміші рівних об'ємів хлороформу Р і метанолу Р та доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинів до 10 мл.

**Перстач прямостоячий**

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю G P.

**Рухома фаза:** вода P - метанол P - етилацетат P (7.5:10:75).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл. смугами 2 см × 0.3 см.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** до випаровування розчинників.

**Виявлення:** обприскують сумішшю 2 об'ємів розчину 10 г/л хлораміну P і 8 об'ємів розчину 250 г/л трихлороцтової кислоти P у 96 % спирті P, потім нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** у нижній частині хроматограми розчину порівняння виявляється зона світло-синьої флуоресценції, відповідна пурпуреаглікозиду В, а також вище неї зона коричнювато-жовтої флуоресценції, відповідна пурпуреаглікозиду А. Зона світло-синьої флуоресценції, відповідна гітоксину, виявляється у середній частині хроматограми, і вище неї зона коричнювато-жовтої флуоресценції, відповідна дигітоксину. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися зони, на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за розміром і забарвленням. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

**Д.** 5 мл хлороформного розчину, одержаного у випробовуванні Ідентифікація С, упарюють насухо на водяній бані. До одержаного залишку додають 2 мл розчину кислоти динітробензойної P і 1 мл 1 М розчину натрію гідроксиду. Через 5 хв з'являється червонувато-фіолетове забарвлення.

**Е.** 5 мл хлороформного розчину, одержаного у випробовуванні Ідентифікація С, упарюють насухо на водяній бані. До одержаного залишку додають 3 мл розчину ксантигідролу P і нагрівають на водяній бані протягом 3 хв; з'являється червоне забарвлення.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не має бути рідко опушених або голих листків, клітини епідерми яких (вигляд із поверхні) мають намистоподібні антиклінальні оболонки (*Digitalis lanata*).

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 6.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 12.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 5.0 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

0.250 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) струшують із 50.0 мл води P протягом 1 год, додають 5.0 мл розчину 150 г/л свинцю(II) ацетату P, струшують, через декілька хвилин додають 7.5 мл розчину 40 г/л натрію гідрофосфату P і фільтрують крізь гофрований паперовий фільтр. 50.0 мл одержаного фільтрату із 5 мл кислоти хлористоводневої (150 г/л HCl) нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 1 год. Переносять у ділильну лійку, промивають колбу 2 порціями, по 5 мл кожна, води P, струшують із 3 порціями, по 25 мл кожна, хлороформу P. Об'єднані хлороформні шари висушують над натрію сульфатом безводним P, фільтрують і доводять об'єм розчину хлороформом P до 100.0 мл. 40.0 мл хлороформного розчину упарюють насухо. Одержаний залишок розчиняють у 7 мл спирту (50 % об/об) P, додають 2 мл розчину кислоти динітробензойної P і 1 мл 1 М розчину натрію гідроксиду. Паралельно готують розчин порівняння як зазначено нижче. 50.0 мг ФСЗ дигітоксину розчиняють у 96 % спирті P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять 96 % спиртом P до об'єму 50.0 мл. До 5.0 мл одержаного розчину додають 25 мл води P і 3 мл кислоти хлористоводневої (150 г/л HCl), нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 1 год і виконують приготування як зазначено вище. Вимірюють оптичну густину (2.2.25) 2 розчинів за довжини хвилі 540 нм декілька раз протягом перших 12 хв до досягнення максимуму, використовуючи як компенсаційну рідину суміш 7 мл спирту (50 % об/об) P, 2 мл розчину кислоти динітробензойної P і 1 мл 1 М розчину натрію гідроксиду.

Вміст серцевих глікозидів, у перерахунку на дигітоксин, обчислюють за оптичною густиною та концентраціями розчинів.

**ЗБЕРІГАННЯ**

У захищеному від вологи місці.

**ПЕРСТАЧ ПРЯМОСТОЯЧИЙ****Tormentillae rhizoma****TORMENTIL**

Цілі або різані, висушені кореневища без коренів *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. (*P. tormentilla* Stokes).

**Вміст:** не менше 7 % танінів, у перерахунку на пірогалол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; М.м. 126.1) і суху сировину.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Кореневище циліндрично-веретеноподібної форми, дуже тверде та мало галузисте, із дуже неправильної форми, часто скрученими, вузлуватими бульбами, близько 10 см завдовжки та від 1 см до 2 см завтовжки. Поверхня від коричневого до червонувато-коричневого кольору, зморшкувата, із залишками коренів і поперечно видовженими, увігнутими, білуватими рубцями від стебел. На верхівці кореневища можуть бути наявними залишки численних надземних стебел. Злам рівний і зернистий, від темно-червоного до коричнево-жовтого кольору.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: крупнозубчасті друзи кальцію оксалату, до 60 мкм у діаметрі; фрагменти тонкостінної паренхіми, клітини якої містять танін червонувато-коричневого кольору; групи вузьких облямовано-пористих судин із бічними порами; паренхіма із товстостінних та пористих багатокутних клітин; групи та фрагменти товстостінних склеренхімних волокон; зрідка фрагменти корка із тонкостінних, коричневих табличчастих клітин. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину Р. У порошку виявляються кулясті або еліптичні крохмальні зерна, близько до 2 мкм завдовжки.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфата безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском, одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл етилацетату Р.

*Розчин порівняння.* 1.0 мг катехіну Р розчиняють в 1.0 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* кислота оцтова льодяна Р- ефір Р- гексан Р- етилацетат Р (20:20:20:40).

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі протягом від 10 хв до 15 хв.

*Виявлення:* обприскують свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р, виявляються червонуваті зони. Пластинку витримують у парі аміаку, зони стають інтенсивнішими, червонувато-коричневими. Переглядають при денному світлі.

*Результати:* нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробову-

ваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші слабші зони.

Верхня частина пластинки	
катехін: інтенсивна червонувато-коричнева зона	інтенсивніша червонувато-коричнева зона (катехін)
	слаба зона
	інтенсивна зона
	слабі зони
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки** (2.8.2). Не більше 3 % коренів і стебел, а також кореневищ із чорним зломом, не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Кадмій** (2.4.27). Не більше 0.00020 % (2.0 ppm).

**Втрата в масі при висушуванні** (2.2.32). Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола** (2.4.16). Не більше 5.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають вміст танінів у сировині (2.8.14), використовуючи 0.500 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12).

N

Дозволяється ідентифікацію С проводити за наведеною нижче методикою.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфату безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл етилацетату Р.

*Розчин порівняння.* До 0.1 г ФСЗ ДФУ перстачу екстракту сухого додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфату безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл етилацетату Р.

## Перстачу прямостоячого настойка

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ефір Р - гексан Р - етилацетат Р (20:20:20:40).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом від 10 хв до 15 хв.

**Виявлення:** обприскують свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р; виявляються червонуваті зони. Пластинку витримують у парі аміаку; зони стають інтенсивнішими, червонувато-коричневими. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)	інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)
слаба зона	слаба зона
інтенсивна зона	інтенсивна зона
слаба зона	слаба зона
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ПЕРСТАЧУ ПРЯМОСТОЯЧОГО НАСТОЙКА

### Tormentillae tinctura

#### TORMENTIL TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Перстач прямостоячий».

**Вміст:** не менше 1.5 % (м/м) танінів, у перерахунку на пірогалол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; М.м. 126.1).

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини та 5 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис:** Рідина червоного або червонувато-коричневого кольору.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 1.0 мл настойки змішують із 1.0 мл спирту (70 % об/об) Р.

**Розчин порівняння.** 1.0 мг катехіну Р розчиняють в 1.0 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ефір Р - гексан Р - етилацетат Р (20:20:20:40).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом від 10 хв до 15 хв.

**Виявлення:** обприскують свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р; з'являються червонуваті зони. Пластинку витримують у парі аміаку; зони стають інтенсивнішими, забарвлюються у червонувато-коричневий колір. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину.

Верхня частина пластинки	
катехін: інтенсивна зона	інтенсивна зона (катехін)
	слаба зона
	інтенсивна зона
	слабі зони
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Етанол** (2.9.10). Від 64 % (об/об) до 69 % (об/об).

**Метанол і 2-пропанол** (2.9.11). Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають вміст танінів у лікарській рослинній сировині (2.8.14), використовуючи 2.50 г настойки.

Дозволяється ідентифікацію проводити за наведеною нижче методикою.

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 1.0 мл настойки змішують із 1.0 мл спирту (70 % об/об) Р.

**Розчин порівняння.** До 0,1 г ФСЗ ДФУ перстачу екстракту сухого додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв і фільтрують. Фільтрат струшують із 2 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р, об'єднані верхні шари фільтрують над 6 г натрію сульфату безводного Р, фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок розчиняють в 1,0 мл етилацетату Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ефір Р - гексан Р - етилацетат Р (20:20:20:40).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом від 10 хв до 15 хв.

**Виявлення:** обприскують свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р; виявляються червонуваті зони. Пластинку витримують у парі аміаку; зони стають інтенсивнішими, червонувато-коричневими. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)	інтенсивна червонувато-коричнева зона (катехін)
слаба зона	слаба зона
інтенсивна зона слаба зона	інтенсивна зона слаба зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ПОДОРОЖНИКА ВЕЛИКОГО ЛИСТЯ<sup>N</sup>

### Plantaginis majoris folium

Цілі або фрагментовані, висушені, зібрані під час цвітіння листки *Plantago major* L.

**Вміст:**

- полісахаридів: не менше 12 %, у перерахунку на суху сировину;
- суми похідних орто-дигідроксикоричної кислоти: не менше 1,5 %, у перерахунку на актеозид (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>; М.м. 624,6) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Пластинка листка зелена або коричнювато-зелена, із від 3 до 9 дугоподібними жилками, ціль-

ним або дещо зубчастим краєм, широкоеліптична, від 3 см до 11 см завширшки, звужена у широкий черешок різної довжини, разом із черешком досягає до 24 см завдовжки. На зламі черешка видимі залишки темних ниткоподібних жилок.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок зеленого або коричнювато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгидрату Р. У порошку виявляються: фрагменти верхньої епідерми із багатокутних клітин із прямими оболонками; фрагменти нижньої епідерми із клітин зі слабозвивистими оболонками; фрагменти епідерми із продиховими апаратами аномоцитного типу (2.8.3) із 3 або 4 побічними клітинами; покривні волоски багатоклітинні, із гладенькою поверхнею та розширеною основою; фрагменти епідерми із розетками клітин у місці прикріплення покривних волосків; залозисті волоски із одноклітинною ніжкою та видовженою двоклітинною голівкою; дуже рідко залозисті волоски із багатоклітинною ніжкою та кулястою або овальною одноклітинною голівкою.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** ▽ Розчин готують безпосередньо перед використанням. ▲ До 1,0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р, струшують протягом 15 хв та фільтрують.

**Розчин порівняння.** ▽ 1 мг ▲ нафтолового жовтого Р та 2 мг рутину Р розчиняють у 2 мл метанолу Р.

**Пластинка.** ТШХ пластинка із шаром силікагелю F<sub>254</sub> Р.

▽ Рухома фаза: кислота оцтова льодяна Р - вода Р - етилацетат Р (20:20:60). ▲

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** нагрівають відразу після хроматографування протягом 5-10 хв при температурі 120 °С.

**Виявлення А:** переглядають при денному світлі.

**Результати А:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння.

Верхня частина пластинки	
	жовта зона
рутин: жовта зона	жовта зона
нафтоловий жовтий: жовта зона	▽ слаба ▲ блакитна зона (аукубін)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

**Виявлення В:** обприскують розчином диметиламінобензальдегіду *P*2, використовуючи 5 мл на пластинку площею 200 мм<sup>2</sup>; нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв до проявлення плям; переглядають при денному світлі.

**Результати В:** на хроматограмі випробовуваного розчину виявляється інтенсивна зона, відповідна аукубіну, що змінює свій колір від коричнюватого до синьо-сірого. Близько фронту розчинників виявляється темно-зелена зона, відповідна хлорофілам.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5 % листків іншого кольору, не більше 1 % квітконосних стрілок, не більше 2 % сторонніх часток.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 14 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 20 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 6 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Полісахариди.** Близько 5 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини (750) (2.9.12) поміщають у колбу із притертою склянкою пробкою місткістю 250 мл, додають 100 мл *води P*, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв і декантують у мірну колбу місткістю 250 мл крізь скляну лійку із 5 шарами марлі, попередньо змоченої *водою P*. Екстрагування продовжують 2 порціями, перша — 100 мл *води P*, друга — 50 мл *води P*, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Кожний витяг охолоджують, центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв і декантують у ту саму мірну колбу. Фільтр промивають *водою P* і доводять об'єм розчину *водою P* до позначки.

25 мл одержаного розчину поміщають у центрифужну пробірку, додають 75 мл 96 % *спирту P*, перемішують, нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв, витримують протягом 1 год і центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрують під вакуумом за залишкового тиску від 13 кПа до 16 кПа крізь скляний фільтр ПОР16, попередньо висушений при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші *вода P* - 96 % *спирт P* (1:3) і послідовно промивають 15 мл 96 % *спирту P*, 10 мл *ацетону P*, 10 мл *етилацетату P*. Фільтр із осадом сушать на повітрі,

потім висушують до постійної маси при температурі від 100 °С до 105 °С.

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

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

де:

*m* — маса наважки сировини, у грамах,

*m*<sub>1</sub> — маса фільтра, у грамах,

*m*<sub>2</sub> — маса фільтра із залишком, у грамах,

*W* — втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

## Сума похідних орто-дигідроксикоричної кислоти

**Вихідний розчин.** 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у колбу, додають 90 мл *спирту (50 % об/об) P*, кип'ятять у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Колбу та фільтр промивають 10 мл *спирту (50 % об/об) P*. Одержаний фільтрат і промивну рідину об'єднують і доводять *спиртом (50 % об/об) P* до об'єму 100.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** У мірну колбу місткістю 10 мл поміщають, перемішуючи після кожного додавання, 1.0 мл вихідного розчину, 2 мл 0.5 *M розчину кислоти хлористоводневої*, 2 мл розчину, приготованого розведенням 10 г *натрію нітриту P* і 10 г *натрію молібдату P* у 100 мл *води P*, і 2 мл розчину *натрію гідроксиду розведеного P*. Одержаний розчин доводять *водою P* до об'єму 10.0 мл.

Відразу вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм, використовуючи як компенсаційну рідину розчин, приготований таким чином: у мірну колбу місткістю 10 мл поміщають, перемішуючи після кожного додавання, 1.0 мл вихідного розчину, 2 мл 0.5 *M розчину кислоти хлористоводневої* і 2 мл розчину *натрію гідроксиду розведеного P* і доводять *водою P* до об'єму 10.0 мл.

Вміст суми похідних орто-дигідроксикоричної кислоти, у перерахунку на актеозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m}$$

де:

*A* — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм,

*m* — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання актеозиду за довжини хвилі 525 нм, що дорівнює 185.

## ПОЛИН ГІРКИЙ

## Absinthii herba

## WORMWOOD

Прикореневі листки або слабо олистяні, квітучі верхівки, або суміш цих висушених, цілих або різаних органів *Artemisia absinthium* L.

**Вміст:** не менше 2 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на суху сировину.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Листки сіруватого або зеленуватого кольору, густо опушені на обох поверхнях. Прикореневі листки довгочерешкові, із трикутною або овальною, двічі або тричі перисторозсіченою пластинкою із округлими або ланцетними сегментами. Стеблові листки менш розчленовані, верхні листки ланцетні. Стебло у квітконосній частині зеленувато-сірого кольору, повстяне, близько 2.5 мм у діаметрі та, звичайно, із 5 подовжніми сплюсненими борозенками. Кошики зібрані у нещільні волоти, що розвиваються у пазухах ланцетних або слабо перисторозчленованих листків; кошики від кулястої до сплюснено півкулястої форми, 2-4 мм у діаметрі, вони складаються із сірої, повстяної обгортки, приквіткі її зовнішнього ряду лінійні, а внутрішнього — овальні, із тупою верхівкою та тонко півчастим краєм; ложе кошика із дуже довгими лусками, близько 1 мм завдовжки або довшими, численними жовтими, трубчастими, двостатевими квітками близько 2 мм завдовжки та декількома жовтими крайовими, несправжньоаязичковими квітками.

**В.** Мікроскопічне дослідження (2.8.23). Порошок зеленувато-сірого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин *хлоральгідрату Р*. У порошок виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1380.-1): численні Т-подібні покривні волоски [А], що складаються із короткої, однорядної ніжки із 1-5 дрібних клітин і розташованої перпендикулярно, дуже довгої, хвилястої верхівкової клітини із загостреними кінцями; фрагменти епідерми — вигляд із поверхні [D] із клітин зі звивистими або хвилястими оболонками, продихових апаратів аномоцитного типу (2.8.3) [Da], покривних волосків [Db] і ефіроолійних залозок із олією [Dc] або без олії [Dd], кожна із них має коротку, дворядну, 2-клітинну ніжку та дворядну голівку із 2-4 клітин; ізольовані ефіроолійні залозки — вигляд збоку [C]; фрагменти віночків трубчастих і крайових квіток, деякі із дрібними друзами кальцію оксалату [H]; численні лусочки, кожна із них складається із дрібної клітини-ніжки та дуже довгої, циліндричної, тонкостінної, кінцевої клітини близько 1-1.5 мм завдовжки, цілі лусочки [E] або лише їх дистальна

частина [B]; кулясті пилкові зерна, близько 30 мкм у діаметрі, із 3 порами та дрібно бородавчастою екзиною [G]; фрагменти судинної тканини листка [F] або стебла [J] із судин зі спіральними або кільчастими потовщеннями [Fa] або судин із облямованими порами [Ja], волокон [Fb, Jb] і паренхіми із клітин із помірно потовщеними та пористими оболонками [Fc, Jc].

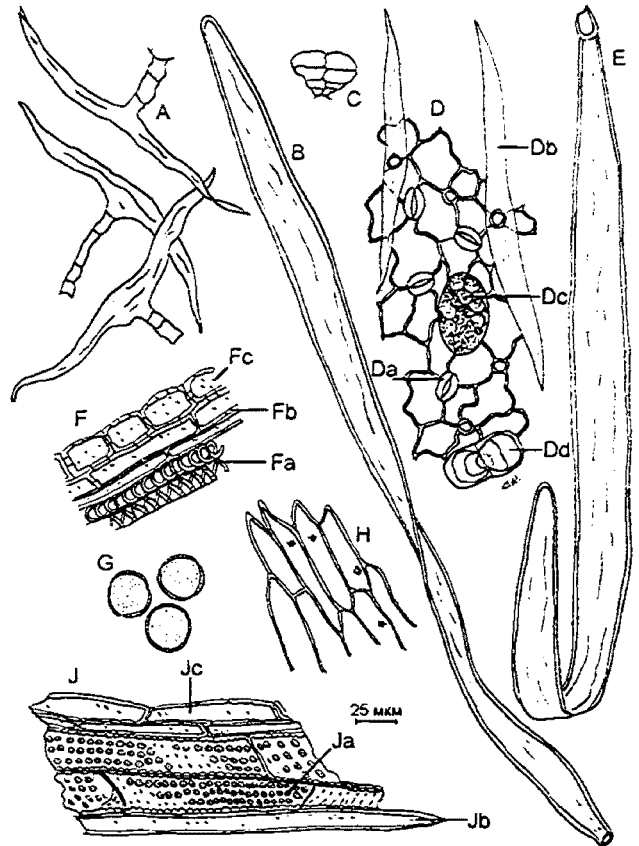


Рисунок 1380.-1. — Діагностичні структури полину гіркого (Ідентифікація В)

## С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 2 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у 50 мл киплячої води Р, витримують протягом 5 хв, струшуючи колбу декілька разів. Після охолодження додають 5 мл розчину 100 г/л свинцю (II) ацетату Р, змішують і фільтрують, обполіскують колбу і залишок на фільтрі 20 мл води Р, струшують фільтр із залишком із 50 мл метиленхлориду Р. Органічний шар відокремлюють, висушують над натрію сульфатом безводним Р, фільтрують і упарюють фільтрат насухо на водяній бані, одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл 96 % спирту Р.

**Розчин порівняння.** 2 мг метилового червоного Р і 2 мг резорцину Р розчиняють у 10.0 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухама фаза:** ацетон Р - кислота оцтова льодяна Р - талуал Р - метиленхлорид Р (10:10:30:50).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухама фаза:** 15 см від лінії старту.



## Поля гіркий

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення А:** обприскують розчином оцтового ангідриду - кислоти сірчаної Р і переглядають при денному світлі.

**Результати А:** на хроматограмі випробовуваного розчину виявляється синя зона, відповідна артабсину, майже над червоною зоною, відповідною метиловому червоному на хроматограмі розчину порівняння.

**Виявлення В:** переглядають при денному світлі, нагріваючи при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв.

**Результати В:** на хроматограмі розчину порівняння у середній третині виявляються червона зона, відповідна метиловому червоному, та нижче неї світло-рожева зона, відповідна резорцину. На хроматограмі випробовуваного розчину виявляється інтенсивна червона або коричнювато-червона зона абсинтину, що відповідає зоні резорцину на хроматограмі розчину порівняння за значенням  $R_f$ . Інші видимі зони менш інтенсивні ніж зона, відповідна абсинтину.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5 % стебел більше 4 мм у діаметрі; не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Показник гіркоти (2.8.15).** Не менше 10 000.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не менше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 12.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 1.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Проводять визначення вмісту ефірної олії (2.8.12). Використовують 50.0 г різаної сировини, круглодонну колбу місткістю 1000 мл, 500 мл води Р як дистильційну рідину та 0.5 мл ксилолу Р у градуйованій трубці. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом не менше 3 год.

N

Зазначена сировина має витримувати наведені вище вимоги із такими змінами.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

В. Ефіроолійні залозки при малому збільшенні мікроскопа видимі на фрагментах пластинки листка

як світлі плями; при великому збільшенні мікроскопа ефіроолійні залозки трапляються зрідка вздовж краю фрагментів пластинки листка або зав'язі, вони деформовані після висихання сировини: видима лише кутикула, що оточує зім'яті оболонки секреторних клітин.

*Допускається використання сировини із таким нормуванням.*

**Вміст:**

*різана сировина:*

— ефірна олія: не менше 1.5 мл/кг, у перерахунку на суху сировину.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 3 % потемнілих частин трави; не більше 3 % стебел більше 3 мм у діаметрі; не більше 3.5 % сторонніх часток, у тому числі не більше 1.5 % домішок мінерального походження.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не менше 13 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

*Випробування, що рекомендується.*

**Екстрактивні речовини.** Не менше 20 %.

Близько 1.0 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) поміщають у конічну колбу, додають 50 мл спирту (70 % об/об), закривають колбу пробкою, зважують (із точністю  $\pm 0.01$  г), витримують протягом 1 год, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 2 год і охолоджують. Колбу закривають тією самою пробкою, зважують, доводять спиртом (70 % об/об) до початкової маси, перемішують і фільтрують. 25 мл одержаного фільтрату упарюють на водяній бані насухо та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси.

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

$$\frac{m \times 200 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}$$

де:

$m$  — маса сухого залишку, у грамах,

$m_1$  — маса наважки сировини, у грамах,

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

*За наявністю необхідного наукового обґрунтування допускається введення в окрему статтю інших підходящих методик визначення, показників якості та/або їх нормування.*

# ПОМЕРАНЦЮ ГІРКОГО ЕКЗОКАРПІЙ І МЕЗОКАРПІЙ

## Aurantii amari epicarpium et mesocarpium

### BITTER-ORANGE EPICARP AND MESOCARP

Висушені екзокарпій і мезокарпій зрілих плодів *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.) із частково видаленою білою губчастою тканиною мезокарпії та ендокарпії.

**Вміст:** не менше 20 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на безводну сировину.

### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має ароматний запах і пряний гіркий смак.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Сировина складається зі шматочків еліптичної або неправильної форми, від 5 см до 8 см завдовжки, від 3 см до 5 см завширшки та близько 3 мм завтовшки. Зовнішня поверхня жовтавого або червонувато-коричневого кольору та помітно плямиста, внутрішня поверхня жовтавого або коричнювато-білого кольору.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок світло-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошок виявляються: дрібні, із дещо потовщеними антиклінальними оболонками, багатокутні клітини, що заповнені оранжево-червоними хромопластами; дуже рідко продихові апарати аномоцитного типу (2.8.3); фрагменти гіподерми із клітин із колєнхіматозними потовщеннями оболонки; групи клітин паренхіми із призматичним кристалом кальцію оксалату у кожній із них; фрагменти лізигенних ефіроолійних вмістищ; клітини паренхіми із кристалами гесперидину, що у розчині 20 г/л калію гідроксиду Р набувають жовтого забарвлення.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р і нагрівають у водяній бані при температурі 65 °С протягом 5 хв, енергійно струшуючи, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 1.0 мг нарингину Р і 1.0 мг кислоти кофейної Р розчиняють в 1 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** вода Р - кислота мурашина безводна Р - етилацетат Р (10:15:75).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі, нагрівають при температурі, від 110 °С до 120 °С протягом 5 хв.

**Виявлення:** теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р. Не раніше ніж через 1 год переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

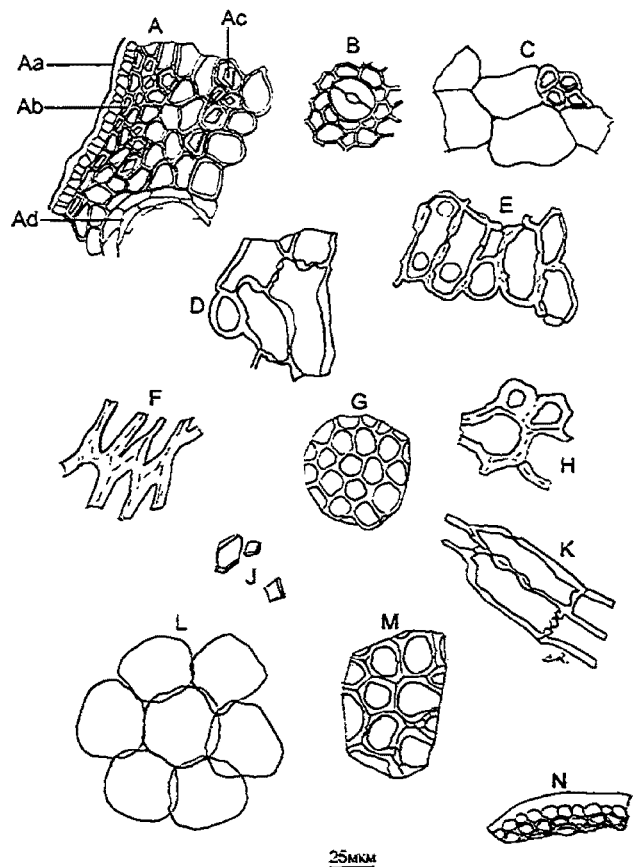


Рисунок 1603.-1. — Діагностичні структури померанцю гіркої екзокарпії та мезокарпії (Ідентифікація В)

- А.** Фрагмент поперечного зрізу, на якому показані екзокарпій із товстою кутикулою (Аа), колєнхіматозна гіподерма (Аб), частина паренхіми мезокарпії, клітини якої містять призми кристалів (Ас) кальцію оксалату та фрагмент ефіроолійного вмістища (Ад)
- В.** Фрагмент екзокарпії із продиховим апаратом аномоцитного типу (виділення з поверхні)
- С.** Група клітин мезокарпії із кристалами кальцію оксалату
- Д, Е, Ф, Н, К та М.** Фрагменти мезокарпії
- Г.** Клітини колєнхіматозної гіподерми, розташованої під екзокарпієм
- Ж.** Призми кристалів кальцію оксалату
- Л.** Група клітин паренхіми
- Н.** Фрагмент екзокарпії із товстою кутикулою та гіподермою із колєнхіматозними потовщеннями клітинних оболонки (на поперечному зрізі)

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
	світло-блакитна флуоресцююча зона
	світло-блакитна флуоресцююча зона
кофейна кислота: світло-блакитна флуоресцююча зона	
	світло-блакитна флуоресцююча зона
	світло-блакитна флуоресцююча зона
нарингін: темно-зелена флуоресцююча зона	темно-зелена флуоресцююча зона (нарингін)
	червона флуоресцююча зона (неоеріоцитрин)
	оранжева флуоресцююча зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Вода (2.2.13).** Не більше 10.0 %. Визначають методом відгону із 20.0 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12).

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 7.0 %.

**Екстрактивні речовини.** Не менше 6.0 %.

До 2.000 г здрібноної на порошок сировини (250) (2.9.12) додають суміш 3 мл води *P* і 7 мл 96 % спирту *P*, екстрагують протягом 2 год, енергійно струшуючи, фільтрують, 2.000 г одержаного фільтрату упарюють насухо на водяній бані та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 3 год, охолоджують в ексикаторі над фосфором(V) оксидом *P* і зважують. Маса одержаного залишку має бути не менше 120 мг.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять як зазначено у статті (2.8.12). Використовують 15.0 г свіжоздрібноної на порошок сировини (710) (2.9.12), круглодонну колбу місткістю 500 мл, 200 мл води *P* як дистиляційну рідину та 0.5 мл ксилолу *P* у градуйованій трубі. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 90 хв.

## ПРИВОРОТЕНЬ

### Alchemillae herba

#### ALCHEMILLA

Цілі або різані, висушені, квітучі надземні частини *Alchemilla vulgaris* L. *sensu latiore*.

**Вміст:** не менше 6.0 % танінів, у перерахунку на пірогалол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; *M.m.* 126.1) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Прикореневі листки сірувато-зеленого, частково коричнювато-зеленого кольору, у більшій частині сировини ниркоподібні або майже напівкруглі, переважно близько 8 см, зрідка близько 11 см у діаметрі, мають від 7 до 9 або 11 лопатей і довгий черешок. Стеблові листки дрібніші, мають пару великих прилистків біля основи, 5-9 лопатей і короткий черешок, або вони сидять. Листки густо опушені, особливо на нижній поверхні, та мають крупно зубчастий край. Молоді листки складчасті, із білувато-сріблястим опушенням; старіші листки мало опушені, із тонким сітчастим жилкуванням, виступаючим на нижній поверхні. Сірувато-зелений або жовтаво-зелений черешок опушений, близько 1 мм у діаметрі, із адаксіальною борозенкою. Безпелюсткові квітки жовтаво-зеленого або світло-зеленого кольору, близько 3 мм у діаметрі. Чашечка подвійна, складається із 4 дрібних сегментів підчаші, що чергуються із 4 крупнішими чашолистками, де-що звуженими або трикутними. Квітки мають 4 короткі тичинки та один плодолистик із головчастою приймочкою. Сірувато-зелене або жовтаво-зелене стебло опушене, більш або менш подовжньо зморшкувате та порожнисте.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок сірувато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*. У порошку виявляються: одноклітинні, вузькі волоски близько 1 мм завдовжки, частково звивисті, загострені та невиразно пористі на верхівці, із потовщеними, здерев'янілими оболонками, частково розширені та пористі біля основи; фрагменти листків із 2 шарами палисадної паренхіми, верхній шар якої у 2-3 рази вищий за нижній, та із губчастою паренхімою, клітини якої містять розсіяні друзи кальцію оксалату близько 25 мкм у діаметрі; фрагменти епідерми листка (вигляд із поверхні) із клітин зі звивистими або хвилястими оболонками, антиклінальні оболонки їх нерівномірно і намистоподібно потовщені, та продихових апаратів аномоцитного типу (2.8.3); групи провідної тканини зі спіральними або пористими судинами та здерев'янілими волокнами із черешків і стебел; зрідка тонкостінні конічні волоски, близько 300 мкм

завдовжки; тонкостінні клітини паренхіми із друзами кальцію оксалату; кулясті пилкові зерна, близько 15 мкм у діаметрі, із 3 чіткими порами та зернистою екзиною; зрідка фрагменти стінки зав'язі із клітин, що містять поодинокі кристали кальцію оксалату.

#### С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 5 мл метанолу Р, нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником при температурі 70 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 1.0 мг кислоти кофейної Р і 1.0 мг кислоти хлорогенової Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - вода Р - етилацетат Р (8:8:84).

**Об'єм проб, що наносяться:** 20 мкл випробовуваного розчину, 10 мкл розчину порівняння, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв.

**Виявлення:** пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р і висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчин. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
кофейна кислота: світло-блакитна зона	2 червоні флуоресцюючі зони (хлорофіл)  1 або 2 інтенсивні світло-блакитні флуоресцюючі зони  одна або декілька інтенсивних зелених або зеленувато-жовтих флуоресцюючих зон
хлорогенова кислота: світло-блакитна флуоресцююча зона	інтенсивна жовта або оранжева флуоресцююча зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини

(355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 12.0 %.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення танінів проводять як зазначено у статті (2.8.14). Використовують 0.50 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12).

## РАТАНІЇ КОРЕНІ

### Ratanhia radix

#### RHATANY ROOT

Висушені, звичайно фрагментовані, підземні органи *Krameria triandra* Ruiz et Pavon, відомої як Перувіанська ратанія.

**Вміст:** не менше 5.0 % танінів, у перерахунку на пірогалол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; М.м. 126.1) і суху сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Головний корінь темно-червонувато-коричневого кольору, із товстою, вузлуватою кореневою шийкою. Бічні корені такого ж кольору, майже прямі або дещо звивисті. Кора шершава або луската на старіших шматочках, на молодших шматочках вона гладенька, із чіткими поперечними тріщинами; вона легко відокремлюється від деревини. Злам волокнистий у корі та заїдликий у деревині. На поперечному зрізі виявляються: темно-коричнювато-червона кора із гладенькою поверхнею, близько третини радіуса завтовшки; щільна, блідо-червонувато-коричневого кольору, дрібно пориста деревина із численними тонкими серцевинними променями; центральне ядро часто темнішого кольору.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок коричнювато-червоного кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються: клітини корки, що містять флобафени темно-коричневого кольору; фрагменти нездерев'янілих флоемних волокон, звичайно від 12 мкм до 30 мкм у діаметрі, із помірно потовщеними оболонками; ряди клітин флоемної паренхіми із призмами та мікрочисталами кальцію оксалату; фрагменти судин звичайно від 20 мкм до 60 мкм у діаметрі, із облямованими порами; фрагменти трахеїд близько 20 мкм завширшки, зі щільноподібними порами. Переглядають під

мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину Р. У порошок виявляються округлі крохмальні зерна, прості або із від 2 до 4 компонентів, окреме зерно близько 30 мкм у діаметрі, деякі зерна можуть знаходитись у клітинах серцевинних променів і паренхіми.

#### С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 1.0 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл суміші вода Р - 96 % спирт Р (3:7), струшують протягом 10 хв і фільтрують. До одержаного фільтрату додають 10 мл петролейного ефіру Р і струшують, петролейний шар відділяють, додають 2 г натрію сульфату безводного Р, струшують і фільтрують, фільтрат упарюють насухо. Одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл метанолу Р.

*Розчин порівняння.* 5.0 мг судану червоного G Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* етилацетат Р - толуол Р (2:98).

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* обприскують розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р, висушують на повітрі, обприскують 0.1 М розчином натрію гідроксиду етанольним, переглядають при денному світлі.

*Результати:* у нижній третині хроматограми розчину порівняння виявляється червона зона судану червоного G. На хроматограмі випробовуваного розчину виявляється фіолетова зона ратанії фенолу I на рівні зони судану червоного G на хроматограмі розчину порівняння, нижче неї — коричнювата зона ратанії фенолу II, нижче неї — синювато-сіра зона ратанії фенолу III. Можуть виявлятися також інші зони.

#### ВИПРОБУВАННЯ

*Сторонні домішки (2.8.2).* Не більше 2 % сторонніх домішок; не більше 5 % фрагментів кореневої шийки або кореня більше 25 мм у діаметрі. Корені без кори можуть бути наявними у вигляді дуже дрібних шматочків.

*Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).* Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібноної на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С.

*Загальна зола (2.4.16).* Не більше 5.5 %.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення танінів проводять як зазначено у статті (2.8.14). Використовують 0.750 г здрібноної на порошок сировини (180) (2.9.12).

## РАТАНІЇ НАСТОЙКА

### Ratanhiae tinctura

#### RHATANY TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Ратанії корені».

*Вміст:* не менше 1.0 % (м/м) танінів, у перерахунку на пірогалол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; М.м. 126.1).

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини сировини і 5 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис:* Рідина червонувато-коричневого кольору.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До 5 мл настойки додають 10 мл петролейного ефіру Р і струшують; відділяють шар петролейного ефіру, додають 2 г натрію сульфату безводного Р, струшують і фільтрують. Фільтрат упарюють насухо, залишок розчиняють у 0.5 мл метиленхлориду Р.

*Розчин порівняння.* 5 мг тимолу Р і 10 мг дихлорфеноліндофенолу натрієвої солі Р розчиняють у 10 мл спирту (60 % об/об) Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* метиленхлорид Р.

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* обприскують розчином 5 г/л міцного синього В, солі Р, висушують на повітрі та обприскують 0.1 М розчином натрію гідроксиду етанольним Р; переглядають при денному світлі.

*Результати:* нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
тимол: оранжево-коричнювато-жовта зона	фіолетова зона
	зеленувато-сіра зона
	синювато-сіра зона
	жовтаво-коричнева зона
дихлорфеноліндофенол: сірувато-блакитна зона	фіолетова зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Етанол (2.9.10). Від 63 % (об/об) до 67 % (об/об).

Метанол і 2-пропанол (2.9.11). Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначають вміст танінів у лікарській рослинній сировині (2.8.14), використовуючи 2.500 г настойки.

## РИМСЬКОЇ РОМАШКИ КВІТКИ

### Chamomillae romanae flos

#### CHAMOMILE FLOWER, ROMAN

Висушені квітучі кошики культивованих махових різновидів *Chamaemelum nobile* (L.) All. (*Anthemis nobilis* L.).

Вміст: не менше 7 мл/кг ефірної олії, у перерахунку на суху сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Квітучі кошики поодинокі, півкулясті, білого або жовтаво-сірого кольору, ложе кошика без порожнини, конічне, вкрите квітками, кожна із них прикрита прозорою маленькою лускою.

Сировина має сильний характерний запах.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Кошик від 8 мм до 20 мм у діаметрі; ложе його без порожнини; основа ложа заокруглена, вкри-

та обгорткою із 2-3 рядів щільно та черепитчасто розташованих приквітків із плівчастими краями. Більшість квіток несправжньоаязичкові, декілька блідо-жовтих трубчастих квіток знаходяться у центрі кошика. Несправжньоаязичкові квітки мають білі, притуплені, ланцетні відгини, зігнуту, темно-коричневу нижню зав'язь, ниткоподібний стовпчик і двороздільну приймочку; трубчасті квітки мають п'ятизубчасту трубочку віночка, 5 спайнопилякових, прирослих до віночка тичинок і маточку такої самої будови як у несправжньоаязичкових квіток.

В. Розділяють кошик на окремі частини. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. Усі частини квітучих кошиків вкриті численними дрібними жовтими блискучими залозистими волосками. Приквітки обгортки та лусочки складаються із видовжених рядів клітин епідерми, склерифікованих біля основи, вкритих конічними волосками, близько 500 мкм завдовжки, кожен із них складається із 3-4 дуже коротких базисних клітин і довгої, зігнутої термінальної клітини близько 20 мкм завширшки. Віночок несправжньоаязичкових квіток складається із сосочкоподібних клітин зі складчастою кутикулою. Зав'язі квіток обох типів мають біля основи кільце склеренхіми із одного ряду клітин. Клітини ложа кошика та зав'язей містять дрібні друзи кальцію оксалату. Пилкові зерна близько 35 мкм у діаметрі, круглястої або трикутної форми, із 3 проростковими порами та шипуватою екзиною.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р, нагрівають при струшуванні у водяній бані при температурі 60 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 2.5 мг апігеніну Р і 2.5 мг апігенін-7-глюкозиду Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: кислота оцтова льодяна Р- вода Р- бутанол Р (17:17:66).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту

Висушування: при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, використовуючи близько 10 мл на пластинку площею 200 мм<sup>2</sup>; обприскують розчином такого самого об'єму 50 г/л макрогалу 400 Р у метанолі Р; витримують протягом близько 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: у верхній третині хроматограми розчину порівняння виявляється жовтаво-зелена флуо-

## Розторопші плоди

ресціююча зона (апігенін), у середній третині — жовтава флуоресціююча зона (апігенін-7-глюкозид). На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися жовтаво-зелена флуоресціююча зона та жовтава флуоресціююча зона на рівні зон апігеніну та апігенін-7-глюкозиду на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за флуоресценцією: вище зони апігенін-7-глюкозиду - коричнювата флуоресціююча зона (лютеолін); безпосередньо нижче зони апігенін-7-глюкозиду - світло-коричнювата флуоресціююча зона (апіїн); безпосередньо нижче зони апіїну — яскраво-блакитна флуоресціююча зона та нижче цієї зони — яскраво-блакитна флуоресціююча зона: можуть виявлятися також інші слабкі зони.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Діаметр квітучих кошиків.** Не більше 3 % квітучих кошиків менше 8 мм у діаметрі.

**Пошкоджені квітучі кошики.** Побурілі або почорнілі квітучі кошики мають бути відсутніми.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 11.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 8.0 %.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять як зазначено у статті (2.8.12). Використовують 20.0 г цільної сировини, круглодонну колбу місткістю 500 мл, 250 мл *води Р* як дисципліну рідину та 0.50 мл *ксилолу Р* у градуйованій трубці. Перегонку проводять зі швидкістю від 3 мл/хв до 3.5 мл/хв протягом 3 год.

## РОЗТОРОПШІ ПЛОДИ

### *Silybi mariani fructus*

#### MILK-TRISTLE FRUIT

Зрілі, звільнені від чубка, плоди *Silybum marianum* (L.) Gaertner.

**Вміст:** не менше 1.5 % силімарину, у перерахунку на силібінін (C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>; М.м. 482.4) і суху сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина не повинна мати прогірклого запаху.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Сім'янка дуже сплюснена, видовжено-обернено-яйцеподібна, близько від 6 мм до 8 мм завдовжки, 3 мм завширшки та 1.5 мм завтовшки; зовнішня поверхня гладенька та блискуча, сірого або блідо-коричневого основного кольору, мінливого через видовжені, темно-коричневі прожилки, тому вся поверхня набуває блідо-сіруватого або коричневого кольору; плід збіжистий до основи та на верхівці із чубком із блискучих, блідо-жовтих видовжень, які формують комірець близько 1 мм заввишки, що оточує залишки стовпчика. На поперечному зрізі плода виявляються вузька, коричнева зовнішня зона та 2 великі, щільні, білково-олійні сім'ядолі.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок коричнювато-жовтого кольору із темнішими цяточками. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *розчин хлоральгідрату Р*. У порошок виявляються: фрагменти екзокарпія із безбарвних, багатокутних (вигляд із поверхні) клітин із порожниною, в залежності від орієнтації, досить великою або у вигляді дрібної шліни; групи паренхімних клітин із пігментного шару, деякі із них заповнені яскраво-червоною речовиною; дуже часто групи великих склереїд із насінної шкірки із яскраво-жовтими пористими оболонками та вузькою порожниною; зрідка фрагменти дрібноклітинної паренхіми із пористими, намистоподібними оболонками; часто тонкостінні клітини паренхіми сім'ядолей із краплями олії та розсіяними друзами кальцію оксалату; дещо крупніші призматичні кристали кальцію оксалату.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) додають 10 мл *метанолу Р*, нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі 70 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують. Одержаний фільтрат упарюють насухо та одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл *метанолу Р*.

**Розчин порівняння.** 2 мг *силібініну Р*, 5 мг *таксифоліну Р* розчиняють у 10 мл *метанолу Р*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром *силікагелю Р*.

**Рухома фаза:** *кислота мурашина безводна Р* - *ацетон Р* - *метиленхлорид Р* (8.5:16.5:75).

**Об'єм проби, що наноситься:** 30 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С.

**Виявлення:** обприскують теплу пластинку розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р*, потім розчином 50 г/л *макрогалу 400 Р* у *метанолі Р*, висушують протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші оранжеві та жовтаво-зелені флуоресцюючі зони між зонами силібініну та таксифоліну.

- рухома фаза А: кислота фосфорна Р - метанол Р - вода Р (0.5:35:65);  
— рухома фаза В: кислота фосфорна Р - метанол Р - вода Р (0.5:50:50);

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 28	100 → 0	0 → 100
28 - 35	0	100
35 - 36	0 → 100	100 → 0
36 - 51	100	0

**Швидкість рухомої фази:** 0.8 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 288 нм.

**Об'єм інжекції:** 10 мкл.

**Час утримування:** силібініну В — близько 30 хв. Якщо необхідно, коригують час градієнтного елювання.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 1.8 для піків силібініну А та силібініну В;  
— одержана хроматограма має відповідати хроматограмі, що надається до ФСЗ розторопші стандартизованого сухого екстракту.

Визначають силікринин, силідіанін, силібінін А, силібінін В, ізосилібінін А та ізосилібінін В шляхом порівняння із хроматограмою, що надається до ФСЗ розторопші екстракту сухого стандартизованого. На хроматограмі випробовуваного розчину пік силідіаніну може варіювати у розмірах, бути відсутнім або наявним як основний пік. Визначають площі піків силікринину, силідіаніну, силібініну А, силібініну В, ізосилібініну А та ізосилібініну В.

Вміст силімарину, у перерахунку на силібінін, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{(A1 + A2 + A3 + A4 + A5 + A6) \times m_1 \times p \times 1000}{(A7 + A8) \times m_2 \times (100 - d)}$$

де:

- A1 — площа піка силікринину на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A2 — площа піка силідіаніну на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A3 — площа піка силібініну А на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A4 — площа піка силібініну В на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A5 — площа піка ізосилібініну А на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A6 — площа піка ізосилібініну В на хроматограмі випробовуваного розчину;  
A7 — площа піка силібініну А на хроматограмі розчину порівняння;  
A8 — площа піка силібініну В на хроматограмі розчину порівняння;  
m<sub>1</sub> — маса ФСЗ розторопші екстракту сухого стандартизованого, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

Верхня частина пластинки	
силібінін: жовтаво-зелена флуоресцююча зона	жовтаво-зелена флуоресцююча зона (силібінін)
таксифолін: оранжева флуоресцююча зона	оранжева флуоресцююча зона (таксифолін)  жовтаво-зелена флуоресцююча зона (силікринин)
	світло-синя флуоресцююча зона (на лінії старту)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 8.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 8.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробуваний розчин.** 5.00 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) поміщають у апарат безперервної екстракції, додають 100 мл *петролейного ефіру* Р і нагрівають у водяній бані протягом 8 год, висушують знежирену сировину при кімнатній температурі та екстрагують в апараті безперервної екстракції 100 мл *метанолу* Р у водяній бані протягом 5 год. Одержаний метанольний екстракт випарюють у вакуумі до об'єму близько 30 мл, фільтрують у мірну колбу місткістю 50 мл, обполіскують екстраційну колбу та фільтр і доводять об'єм *метанолом* Р до 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять *метанолом* Р до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння.** Розчиняють кількість ФСЗ розторопші екстракту сухого стандартизованого, еквівалентну 5.0 мг силібініну (m<sub>1</sub>, г) у *метанолі* Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл.

**Колонка:**

- розмір: 0.125 м × 4 мм;  
— нерухома фаза: силікагель октадецилсильний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**



## Розторопші плоди

- $m_2$  — маса наважки сировини, у грамах;  
 $P$  — загальний вміст силібініну А та силібініну В у ФСЗ розторопші екстракті сухому стандартизованому, у відсотках;  
 $d$  — втрата в масі при висушуванні сировини, у відсотках.

N

Допускається Ідентифікацію С та Кількісне визначення проводити за наведеними нижче методиками.

### С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) додають 10 мл метанолу Р, нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі 70 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують. Одержаний фільтрат упарюють насухо та одержаний залишок розчиняють в 1.0 мл метанолу Р.

**Розчин порівняння.** 0,015 г ФСЗ ДФУ розторопші екстракту сухого помішають у центрифужну пробірку, додають 10 мл метанолу Р, ретельно струшують, оброблюють ультразвуком протягом 10 хв та центрифугують. Використовують надосадову рідину.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** кислота мурашина безводна Р - ацетон Р - метиленхлорид Р (8.5:16.5:75).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 10 см від лінії старту.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С.

**Виявлення:** обприскують теплу пластинку розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р, висушують протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші оранжеві та жовтаво-зелені флуоресціюючі зони між нижньою та верхньою жовтаво-зеленими зонами.

Верхня частина пластинки	
жовтаво-зелена флуоресціююча зона	жовтаво-зелена флуоресціююча зона
оранжева (темно-жовта) флуоресціююча зона	оранжева флуоресціююча зона
жовтаво-зелена флуоресціююча зона	жовтаво-зелена флуоресціююча зона
світло-синя флуоресціююча зона (на лінії старту)	світло-синя флуоресціююча зона (на лінії старту)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Вихідний розчин.** 5.00 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) помішають у апарат безперервної екстракції, додають 100 мл петролейного ефіру Рі нагрівають у водяній бані протягом 4 год, висушують знежирену сировину при кімнатній температурі та екстрагують в апараті безперервної екстракції 100 мл метанолу Р у водяній бані протягом 5 год. Одержаний метанольний екстракт випарюють у вакуумі до об'єму близько 30 мл, фільтрують у мірну колбу місткістю 50 мл, обполіскують екстракційну колбу та фільтр і доводять об'єм метанолом Р до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** 1.0 мл вихідного розчину помішають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл свіжоприготованого динітрофенілгідрозину метанольного розчину Р<sup>N</sup>, закривають колбу, перемішують та витримують при температурі 50 °С протягом 50 хв. Після охолодження доводять об'єм розчину свіжоприготованим калію гідроксиду метанольним розчином Р<sup>N</sup> до позначки, перемішують, через 120 с відбирають 1.0 мл отриманого розчину, переносять у центрифужну пробірку, додають 20 мл метанолу Р та центрифугують.

Надосадову рідину обережно переносять у мірну колбу місткістю 50 мл, до залишку у центрифужній пробірці додають 20 мл метанолу Р, центрифугують та переносять надосадову рідину у ту саму мірну колбу. Доводять об'єм розчину до позначки метанолом Р та перемішують.

Відразу вимірюють оптичну густина (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 490 нм, використовуючи як компенсаційну рідину розчин, приготований аналогічно випробовуваному розчину, де замість 1.0 мл вихідного розчину використовують 1.0 мл метанолу Р.

Вміст силімарину, у перерахунку на силібінін, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 25000}{585 \times m}$$

де:

$A$  — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 490 нм,

$m$  — маса наважки сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання силібініну за довжини хвилі 490 нм, що дорівнює 585.

Замість питомого показника поглинання силібініну допускається використання ФСЗ ДФУ силібініну або ФСЗ ДФУ розторопші екстракту сухого.

Допускається використання сировини із таким нормуванням.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 2 % інших частин рослини; не більше 3 % сторонніх часток, у тому числі не більше 1 % домішок мінерального походження.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 12,0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

За наявності необхідного наукового обґрунтування допускається введення в окрему статтю інших підходящих методик визначення, показників якості та/або їх нормування.

## РУСКУС ШИПУВАТИЙ

### Rusci rhizome

#### BUTCHER'S BROOM

Висушені, цілі або фрагментовані підземні частини *Ruscus aculeatus* L.

Вміст: не менше 1,0 % суми сапогенінів, у перерахунку на рускогеніни (суміш неорускогеніну ( $C_{27}H_{40}O_4$ ; М.м. 428,6) та рускогеніну ( $C_{27}H_{42}O_4$ ; М.м. 430,6) та сушу сировину.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Кореневище складається із жовтавих, розгалужених, членистих, деколи вузлуватих шматків циліндричної або півконічної форми, близько 5-10 см завдовжки та близько 5 мм завтовшки. Поверхня кореневища із помітними тонкими кільцями близько 1-3 мм завширшки, відокремленими одне від одного; округлі рубці від надземних пагонів наявні на верхній поверхні кореневища. На нижній його поверхні трапляються численні корені, або їх рубці; корені близько 2 мм у діаметрі, однакового із кореневищем кольору. Зовнішній шар легко відокремлюється, оголюючи жовтаво-білий, дуже твердий центральний циліндр.

В. Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок жовтавого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1847.-1): групи склерейд із кореневища мінливої форми: округлої, видовженої або прямокутної; оболонки їх помірно потовщені та помітно намистоподібні, із великими, округлими або овальними порами [F, G, K, L, P, Q]; групи округлих клітин паренхіми із потовщеними по кутах оболонками та дрібними, трикутними міжклітинниками [D, E, N]; тонкостінна паренхіма [J], окремі клітини якої містять рафіди кальцію оксалату [С]; групи товстостінних волокон [На] і дрібних судин близько 50 мкм у діаметрі, із численними щілиноподібними

порами у їх оболонках [А, Нв]; зрідка фрагменти покривної тканини кореня [В]; ізольовані рафіди кальцію оксалату [М].

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 1,0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) і 50 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р поміщують у колбу із притертою скляною пробкою місткістю 100 мл, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 40 хв, охолоджують. Нефільтровану суміш екстрагують 3 порціями, по 25 мл кожна, метиленхлориду Р. Органічні розчини об'єднують і сушать над натрію сульфатом безводним Р, фільтрують і упарюють насухо. Одержаний осад розчиняють у 5 мл метанолу Р.

Розчин порівняння. 1 мг ФСЗ рускогенінів Р і 1 мг стиجماتерину Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (5-40 мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10 мкм)).

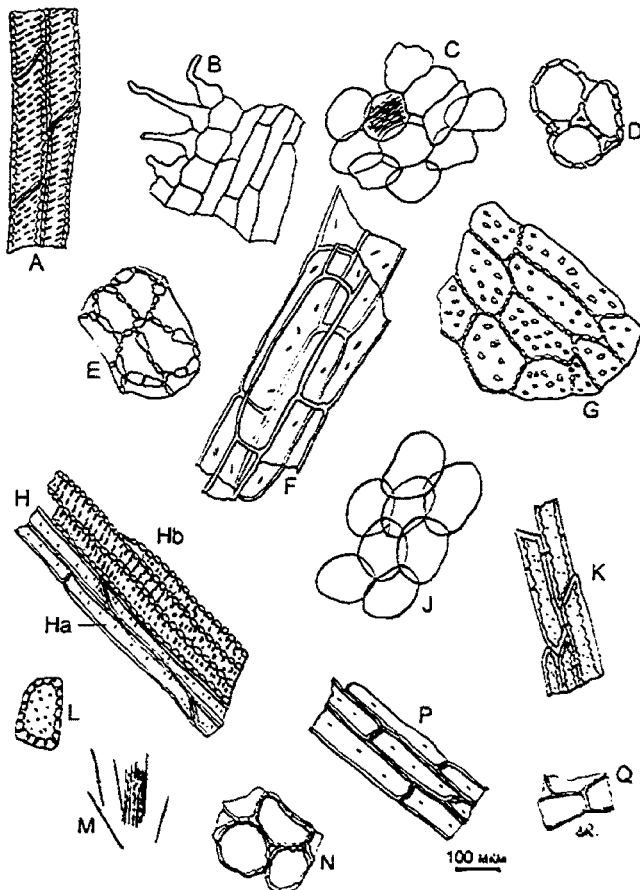


Рисунок 1847.-1. — Діагностичні структури рускуса шипуватого (Ідентифікація В)

Рухома фаза: метанол Р - метиленхлорид Р (7:93).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл (або 4 мкл), смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см (або 6 см) від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

## Рускус шипуватий

**Виявлення:** обприскують ваніліну реактивом *P*, сушать пластинку при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 хв і переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння і випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші слабкі зони.

Верхня частина пластинки	
стигмастерол: фіолетова зона	декілька зон різного кольору фіолетова зона
рускогеніни: жовта зона	фіолетова зона жовта зона (рускогеніни) декілька зон різного кольору
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 5 %.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 12 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 12.0 %.

**Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті (2.8.1).** Не більше 5.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** До 2.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 60 мл етанолу *P*, 15 мл води *P* і 0.2 г калію гідроксиду *P*, екстрагують зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 4 год, охолоджують і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Екстракційну колбу і залишок на фільтрі промивають 3 порціями, кожна по 10 мл етанолу *P*, промивні рідини додають до мірної колби, доводять об'єм розчину етанолом *P* до 100 мл. 25.0 мл розчину поміщають у круглдонну колбу, з'єднану із роторним випарювачем і упарюють насухо. Одержаний залишок розчиняють у 10 мл бутанолу *P*, додають 3 мл кислоти хлористоводневої *P* і 8 мл води *P*, нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 1 год, охолоджують і переносять розчин у мірну колбу об'ємом 100 мл. Круглдонну колбу промивають 3 порціями, кожна

по 20 мл, метанолу *P*, промивні рідини додають у мірну колбу, об'єм розчину доводять метанолом *P* до 100 мл.

**Розчин порівняння.** 5.0 мг ФСЗ рускогенінів розчиняють у 100 мл метанолу *P*.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: вода *P*;

— рухома фаза В: ацетонітрил *P*1;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 25	40	60
25 - 27	40 → 0	60 → 100
27 - 37	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 1.2 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 203 нм.

**Об'єм інжекції:** 20 мкл.

**Ідентифікація піків:** використовують хроматограму, що надається до ФСЗ рускогенінів та хроматограму розчину порівняння для ідентифікації піків неорускогеніну та рускогеніну.

**Відносні часи утримування до неорускогеніну (час утримування неорускогеніну близько 16 хв):** рускогеніну — близько 1.2.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків неорускогеніну та рускогеніну.

**Вміст сапогенінів, у перерахунку на рускогеніни (неорускогенін і рускогенін), у відсотках, обчислюють за формулою:**

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 4 \times p_1}{A_2 \times m_1} + \frac{A_3 \times m_2 \times 4 \times p_2}{A_4 \times m_1}$$

де:

$A_1$  — площа піка рускогеніну на хроматограмі випробовуваного розчину;

$A_2$  — площа піка рускогеніну на хроматограмі розчину порівняння;

$A_3$  — площа піка неорускогеніну на хроматограмі випробовуваного розчину;

$A_4$  — площа піка неорускогеніну на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса наважки сировини, використаної для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

$m_2$  — маса наважки ФСЗ рускогенінів, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

$p_1$  — вміст рускогеніну у ФСЗ рускогенінів, у відсотках;

$p_2$  — вміст неорускогеніну у ФСЗ неорускогенінів, у відсотках.

## СТРУЧКОВИЙ ПЕРЕЦЬ

## Capsici fructus

## CAPSICUM

Висушені, зрілі плоди *Capsicum annuum* L. var. *minimum* (Miller) Heiser та дрібноплодих різновидів *Capsicum frutescens* L.

**Вміст:** не менше 0.4 % суми капсаїциноїдів, у перерахунку на капсаїцин ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ; *M.m.* 305.4) і суху сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має дуже пекучий смак.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Плід жовтаво-оранжевого або червонувато-коричневого кольору, видовжено конічної форми із тупою верхівкою, близько 1-3 см завдовжки та у середній частині до 1 см у діаметрі, зрідка прикріплений до розташованих зовні 5-тизубчастої чашечки та прямої плодоніжки. Оплідень деколи зморщений, гладенький, оточує близько 10-20 плоских, ниркоподібних насінин від 3 мм до 4 мм завдовжки, вільних або прикріплених до червонуватої перегородки.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок оранжевого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 1859.-1): фрагменти екзокарпія — вигляд із поверхні, із клітин, розташованих від 5 до 7 рядами [Е], товстостінних біля плодоніжки [В], вкритих одноманітно складчастою кутикулою [А]; фрагменти оплодня, у поперечному розрізі [D], із екзокарпієм, вкритим товстою кутикулою [Da], та паренхімними клітинами, звичайно, із крапельками червоної олії, зрідка із мікросферичними кристалами кальцію оксалату [Db]; фрагменти ендокарпія [С] із характерними ізольованими групами клітин склеренхіми [Ca] та групами відокремлених тонкостінних клітин паренхіми [Cb]; фрагменти насінин, що мають еліпсомій із крупних, зеленувато-жовтого кольору склереїд зі звивистими оболонками, із тонкими зовнішніми оболонками та сильно і нерівномірно потовщеними радіальними та внутрішніми помітно пористими оболонками [G]; паренхімні клітини ендосперму із крапельками олії та алеїрновими зернами від 3 мкм до 6 мкм у діаметрі [H]; зрідка фрагменти чашечки із зовнішньою епідермою із продиховими апаратами анізоцитного типу (2.8.3) [J], внутрішньою епідермою без продихових апаратів,

із численними залозистими волосками із однорядними ніжками та багатоклітинними голівками [N] та мезофілом [L] із численними ідіобластами, що містять призми кальцію оксалату [La] або мікросферичні кристали кальцію оксалату [Lb]; ізольовані призми [K] або друзи [M] кальцію оксалату; кільчасто та спіральньо потовщені судини [F].

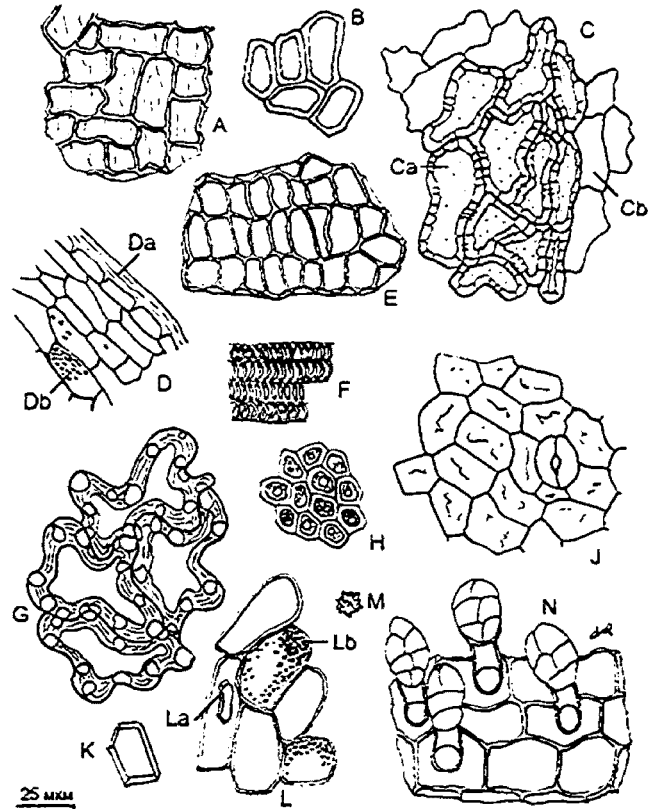


Рисунок 1859.-1. Діагностичні структури стручкового перцю (Ідентифікація В)

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 0.50 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) додають 5.0 мл ефіру Р, струшують протягом 5 хв і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 2 мг капсаїцину Р і 2 мг дигідрокапсаїцину Р розчиняють у 5.0 мл ефіру Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** вода Р - метанол Р (20:80).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 12 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином 5 г/л дихлорхінонхлоріміду Р у метанолі Р. Витримують у парі аміаку до виявлення синіх зон. Переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння і випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
капсаїцин: блакитна зона	блакитна зона (капсаїцин)
дигідрокапсаїцин: блакитна зона	блакитна зона (дигідрокапсаїцин)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Нонівамід.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** До 2.5 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) додають 100 мл метанолу Р, проводять мацерацію протягом 30 хв, поміщають в ультразвукову баню і витримують протягом 15 хв, фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл, обполіскують колбу і фільтр метанолом Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчин порівняння.** 20.0 мг ФСЗ капсаїцину і 4.0 мг ФСЗ нонівамід у розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель фенілсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 30 °С.

**Рухома фаза:** ацетонітрил Р - розчин 1 г/л кислоти фосфорної Р (40:60).

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 225 нм.

**Об'єм інжекції:** 10 мкл.

**Порядок виходу піків:** нордигідрокапсаїцин, нонівамід, капсаїцин, дигідрокапсаїцин.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння;

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків нонівамід та капсаїцину.

Вміст нонівамід у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1}{F_2 \times m_1}$$

де:

$F_1$  — площа піка нонівамід на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_2$  — площа піка нонівамід на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса наважки сировини, у грамах;

$m_2$  — маса ФСЗ нонівамід, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

$p_1$  — вміст нонівамід у ФСЗ нонівамід, у відсотках.

**Нормування:**

— нонівамід: не більше 5.0 % від загального вмісту суми капсаїциноідів.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не має бути плодів *C. annuum* L. var. *longum* Sendtn.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 11.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (500) (2.9.12) сушать при температурі близько 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено при визначенні нонівамід.

Вміст суми капсаїциноідів, у перерахунку на капсаїцин, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \times m_4 \times p_2}{F_4 \times m_3}$$

де:

$F_3$  — площа піка капсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_4$  — площа піка капсаїцину на хроматограмі розчину порівняння;

$F_5$  — площа піка дигідрокапсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_6$  — площа піка нордигідрокапсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;

$m_3$  — маса наважки сировини, у грамах;

$m_4$  — маса ФСЗ капсаїцину, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

$p_2$  — вміст капсаїцину у ФСЗ капсаїцину, у відсотках.

## СТРУЧКОВОГО ПЕРЦЮ НАСТОЙКА

Capsici tincture normata

### CAPSICUM TINCTURE, STANDARDISED

Настойка, одержана із сировини, описаної у статтях «Стручковий перець» або «Рафінована та кількісно визначена смола стручкового перцю».

**Вміст:** від 90 % до 110 % від зазначеного номінального вмісту суми капсаїциноідів, у перерахунку на капсаїцин ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ; М.м. 305.4), якого має бути від 0.020 % (м/м) до 0.060 % (м/м).

## ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із лікарської рослинної сировини або смоли та спирту (від 70 % об/об до 85 % об/об) підходящим методом.

## ВЛАСТИВОСТІ

Опис: Рідина жовтаво-оранжевого або червонувато-оранжевого кольору.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 10 мл випробовуваної настояйки струшують із 10 мл гексану Р, витримують до розшарування рідини та використовують нижній шар.

*Розчин порівняння.* 1 мг капсаїцину Р і 1 мг дигідрокапсаїцину Р розчиняють у 5 мл ефіру Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю октадецилсилільного Р ((5-40) мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю октадецилсилільного Р ((2-10) мкм)).

*Рухома фаза:* вода Р - метанол Р (20:80).

*Об'єм проби, що наноситься:* 20 мкл (або 2 мкл), смугами 15 мм (або 8 мм).

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 12 см (або 6 см) від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* обприскують розчином 0.25 г/л дихлорхінонхлоріміду Р в етилацетаті Р. Витримують у парі ам'яку до виявлення синіх зон. Переглядають при денному світлі.

*Результати:* нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння і випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
капсаїцин: блакитна зона	блакитна зона (капсаїцин)
дигідрокапсаїцин: блакитна зона	блакитна зона (дигідрокапсаїцин)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Нонівамід. Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 50.0 г випробовуваної настояйки доводять метанолом Р до об'єму 100 мл.

*Розчин порівняння.* 20.0 мг ФСЗ капсаїцину і 4.0 мг ФСЗ нонівамиду розчиняють у 100 мл метанолу Р.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель фенілсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 30 °С.

*Рухома фаза:* ацетонітрил Р - розчин 1 г/л кислоти фосфорної Р (40:60).

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 225 нм.

*Об'єм інжекції:* 10 мкл.

*Порядок виходу піків:* нордигідрокапсаїцин, нонівамід, капсаїцин, дигідрокапсаїцин.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння;

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків нонівамиду та капсаїцину.

Вміст нонівамиду, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1}{F_2 \times m_1}$$

де:

$F_1$  — площа піка нонівамиду на хроматограмі випробовуваного розчину;

$F_2$  — площа піка нонівамиду на хроматограмі розчину порівняння;

$m_1$  — маса випробовуваної настояйки, у грамах;

$m_2$  — маса ФСЗ нонівамиду, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;

$p_1$  — вміст нонівамиду у ФСЗ нонівамиду, у відсотках.

*Нормування:*

— нонівамід: не більше 5.0 % від загального вмісту суми капсаїциноїдів.

*Етанол (2.9.10).* Від 95 % до 105 % від зазначеного вмісту.

*Метанол і 2-пропанол (2.9.11).* Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % (об/об) 2-пропанолу.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено при визначенні нонівамиду.

Вміст суми капсаїциноїдів, у перерахунку на капсаїцин, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \times m_4 \times p_2}{F_4 \times m_3}$$

де:

$F_3$  — площа піка капсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;

## Тирлича корені

- $F_c$  — площа піка капсаїцину на хроматограмі розчину порівняння;  
 $F_s$  — площа піка дигідрокапсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;  
 $F_o$  — площа піка нордигідрокапсаїцину на хроматограмі випробовуваного розчину;  
 $m_3$  — маса випробовуваної настойки, у грамах;  
 $m_4$  — маса ФСЗ капсаїцину, взята для приготування розчину порівняння, у грамах;  
 $p_2$  — вміст капсаїцину у ФСЗ капсаїцину, у відсотках.

## ТИРЛИЧА КОРЕНІ

### Gentianae radix

#### GENTIAN ROOT

Висушені, фрагментовані підземні органи *Gentiana lutea* L.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має характерний запах.

Сировина має сильний і стійкий гіркий смак.

Сировина «Тирлича корені» складається із поодиноких або розгалужених півциліндричних шматочків різної довжини та звичайно від 10 мм до 40 мм завтовшки, але зрідка близько 80 мм завтовшки біля кореневої шийки.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Поверхня коричнювато-сірого кольору, поперечний зріз жовтавого або червонувато-жовтого, але не червонувато-коричневого кольору. Корінь подовжньо зморшкуватий, зрідка вкритий рубцями від корінців. Розгалуження кореневища часто несуть на верхівці бруньку, що завжди оточена щільно розташованими залишками листків. Кореневище і корінь ламкі, якщо вони висушені, і розламуються із рівним зламом, але вони швидко поглинають вологу і стають гнучкими. На поперечному зрізі виявляються: із гладенькою поверхнею кора, близько третини радіуса завтовшки, добре помітний камбій, що відділяє не чітко радіальну, переважно паренхімну ксилему.

**B.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок світло-коричневого або жовтаво-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *P*.

У порошок виявляються: фрагменти корково-фелодермного шару (перидерми) із товстостінних, жовтаво-коричневих клітин корка та фелодерми; фрагменти корової та деревинної паренхіми із клітин із помірно потовщеними оболонками, із крапельками олії, дрібними призмами та дуже дрібними голочками кальцію оксалату; фрагменти здерев'янілих судин зі спіральним або сітчастим потовщенням.

**C.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 25 мл метанолу *P*, струшують протягом 15 хв і фільтрують. Фільтрат упарюють насухо під зниженим тиском при температурі не вище 50 °С. Залишок переносять невеликими порціями метанолу *P* до одержання 5 мл розчину, що може містити осад.

**Розчин порівняння.** 5 мг феназону *P* і 5 мг гіперозиду *P* розчиняють у 10 мл метанолу *P*.

**Пластинка:** ТСХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  *P*.

**Рухома фаза:** вода *P* - кислота мурашина безводна *P* - етилформіат *P* (4:8:88).

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** у ненасиченій камері, 8 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення A:** переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

**Результати A:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	виражена зона поглинання
феназон: зона поглинання	
	слаба зона поглинання (амарогентин)
гіперозид: зона поглинання	виражена зона поглинання (гентіопікрозид)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

**Виявлення B:** обприскують розчином 100 г/л калію гідроксиду *P* у метанолі *P*, потім свіжоприготованим розчином 2 г/л міцного синього *B*, сіть *P* у суміші етанол *P* - вода *P* (50:50). Переглядають при денному світлі.

**Результати B:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробову-

ваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	виражена темно-фіолетова зона
	фіолетово-червона зона (амарогентин)
гіперозид: коричнювато-червона зона	слаба світло-коричнева зона (гентіопікрозид)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

Інші види *Gentiana*. Переглядають хроматограму, одержану у випробовуванні С, виявлення В.

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину не мають виявлятися фіолетові зони безпосередньо над зоною амарогентину.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 6.0 %.

Показник гіркоти (2.8.15). Не менше 10000.

Екстрактивні водорозчинні речовини. Не менше 33 %.

До 5.0 г здрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) додають 200 мл киплячої води Р, витримують протягом 10 хв, зрідка струшуючи, охолоджують, доводять об'єм водою Р до 200.0 мл і фільтрують. 20.0 мл фільтрату упарюють насухо на водяній бані, залишок висушують при температурі від 100 °С до 105 °С. Маса залишку має бути не менше 0.165 г.

## ТИРЛИЧА НАСТОЙКА

### Gentianae tinctura

#### GENTIAN TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Тирлича корені».

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку виготовляють із 1 частини здрібненої сировини і 5 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис*: Рідина жовтаво-коричневого або червонувато-коричневого кольору.

Настойка має сильний гіркий смак.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин*. Випробовувана настойка.

*Розчин порівняння*. 5 мг феназону Р і 5 мг гіперозиду І розчиняють у 10 мл метанолу Р.

*Пластинка*: ТШХ пластинка із шаром силікагелк F<sub>254</sub> Р.

*Рухома фаза*: вода Р - кислота мурашина безводна Р - етилформіат Р (4:8:88).

*Об'єм проби, що наноситься*: 20 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза*: 8 см від лінії старту, у ненасиченій камері.

*Висушування*: на повітрі.

*Виявлення А*: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати А*: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони.

Верхня частина пластинки	
феназон: зона поглинання	виражена зона поглинання
	слаба зона поглинання (амарогентин)
гіперозид: зона поглинання	виражена зона поглинання (гентіопікрозид)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

*Виявлення В*: обприскують розчином 10 % калію гідроксиду Р у метанолі Р, а потім свіжоприготованим розчином 2 г/л міцного синього В, солі Р у суміші етанол Р - вода Р (50:50); переглядають при денному світлі.

*Результати В*: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	виражена темно-фіолетова зона
	фіолетово-червона зона (амарогентин)
гіперозид: коричнювато-червона зона	слаба світло-коричнева зона (гентіопікрозид)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин



## Хінного дерева кора

### ВИПРОБУВАННЯ

**Етанол** (2.9.10). Від 62 % (об/об) до 67 % (об/об).

**Показник гіркоти** (2.8.15). Не менше 1000.

**Сухий залишок** (2.8.16). Не менше 5.0 % (м/м); визначення проводять із 3.00 г.

## ХІННОГО ДЕРЕВА КОРА

### Cinchonae cortex

#### CINCHONA BARK

Ціла або різана, висушена кора *Cinchona pubescens* Vahl (*Cinchona succirubra* Pav.), *Cinchona calisaya* Wedd., *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen або їх різновидів, або гібридів.

**Вміст:** не менше 6.5 % суми алкалоїдів, із яких від 30 % до 60 % складають алкалоїди хінніного типу, у перерахунку на суху сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має дуже гіркий, деколи терпкий смак.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Кору стовбура та гілок постачають у вигляді трубчастих або зігнутих шматочків від 2 мм до 6 мм завтовшки. Зовнішня поверхня тьмяно-коричнювато-сірого або сірого кольору, часто вкрита лишайниками; вона звичайно шершава, із поперечними щлинами та подовжньо борозенчаста або зморшкувата; у деяких різновидів зовнішня поверхня відшаровується. Внутрішня поверхня смугаста та темно-червонувато-коричневого кольору; лам рівний у зовнішній частині та волокнистий у внутрішній частині.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок червонувато-коричневого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури (Рисунок 0174.-1): тонкостінні клітини корка, заповнені вмістом червонувато-коричневого кольору — вигляд із поверхні [К], та на поперечному зрізі [Н]; жовті, веретеноподібні, смугасті флоемні волокна близько 90 мкм у діаметрі та близько 1300 мкм завдовжки, дуже товстостінні, із нерівною порожниною та помітними ліycopодібними порами, цілі [А] або фрагментовані [F, J];

паренхімні ідіобласти, заповнені мікропризмами кальцію оксалату [E, G]; друзи у клітинах тонкостінної флоемної паренхіми [L], що оточує серцевинні промені, у тангентальному розрізі [D]. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) гліцерину Р. У порошку виявляються дрібні крохмальні зерна від 6 мкм до 10 мкм у діаметрі; переважно прості, але деколи із 2 або 3 компонентів, вільні [B] або у клітинах паренхіми [C].

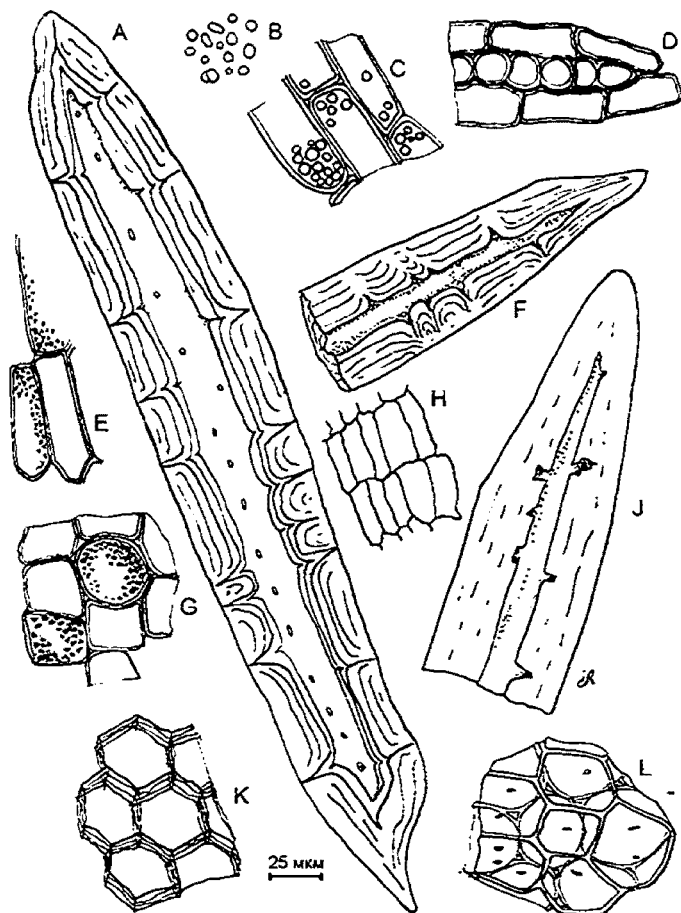


Рисунок 0174.-1. Діагностичні структури хінного дерева кори (Ідентифікація В)

#### С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 0.10 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) поміщають у пробірку, додають 0.1 мл розчину аміаку концентрованого Р і 5 мл метиленхлориду Р, періодично енергійно струшують протягом 30 хв і фільтрують. Одержаний фільтрат упарюють насухо на водяній бані, залишок розчиняють в 1 мл етанолу Р.

**Розчин порівняння.** 17.5 мг хініну Р, 2.5 мг хінідину Р, 10 мг цинхоніну Р і 10 мг цинхонідину Р розчиняють у 5 мл етанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** діетиламін Р - етилацетат Р - толуол Р (10:20:70).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту, двічі.

**Висушування:** при температурі від 100 °С до 105 °С, потім охолоджують.

**Виявлення А:** обприскують кислотою мурашиною безводною Р і висушують на повітрі; переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Результати А:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
хінідин: виражена синя флуоресцююча зона	виражена синя флуоресцююча зона (хінідин)
хінін: виражена синя флуоресцююча зона	виражена синя флуоресцююча зона (хінін)
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

**Виявлення В:** обприскують реактивом йодолатина-ту Р.

**Результати В:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресцюючі зони.

Верхня частина пластинки	
цинхонін: фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою	фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою (цинхонін)
хінідин: фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою	фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою (хінідин)
цинхонідин: інтенсивна темно-синя зона	інтенсивна темно-синя зона (цинхонідин)
хінін: фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою	фіолетова зона, що стає фіолетово-сірою (хінін)
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ВИПРОБУВАННЯ

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 6.0 %.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.23).** Не більше 10 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Випробуваний розчин.** 1.000 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) поміщають у конічну колбу місткістю 250 мм, змішують із 10 мл води Р і 7 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р, нагрівають у водяній бані протягом 30 хв, охолоджують і додають

25 мл метиленхлориду Р, 50 мл ефіру Р і 5 мл розчину 200 г/л натрію гідроксиду Р. Суміш часто струшують протягом 30 хв, додають 3 г здрібненого на порошок трагаканту Р і струшують до одержання прозорої суміші. Одержану суміш фільтрують крізь тампон із вати і промивають колбу та фільтр 5 порціями, по 20 мл кожна, суміші метиленхлорид Р - ефір Р (1:2). Об'єднані фільтрати та промивну рідину упарюють насухо та розчиняють одержаний залишок у 10.0 мл етанолу Р. 5.0 мл одержаного розчину упарюють насухо, залишок розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 1000.0 мл.

**Розчини порівняння.** 30.0 мг хініну Р і 30.0 мг цинхоніну Р розчиняють окремо в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм кожного розчину тією самою кислотою до 1000.0 мл.

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) 3 розчинів за довжини хвилі 316 нм і 348 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Вміст алкалоїдів, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$x = \frac{[A_{316} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348}]}{[A_{316q} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348q}}} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$$y = \frac{[A_{316} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348}]}{[A_{316c} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348c}}} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

де:

*m* — маса наважки сировини, у грамах;

*x* — вміст алкалоїдів хінінного типу, у відсотках;

*y* — вміст алкалоїдів цинхонінного типу, у відсотках;

*A*<sub>316</sub> — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 316 нм,

*A*<sub>348</sub> — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 348 нм,

*A*<sub>316c</sub> — оптична густина розчину порівняння, що містить цинхонін, виміряна за довжини хвилі 316 нм, коригована для концентрації 1 мг/1000 мл,

*A*<sub>316q</sub> — оптична густина розчину порівняння, що містить хінін, виміряна за довжини хвилі 316 нм, коригована для концентрації 1 мг/1000 мл,

*A*<sub>348c</sub> — оптична густина розчину порівняння, що містить цинхонін, виміряна за довжини хвилі 348 нм, коригована для концентрації 1 мг/1000 мл,

*A*<sub>348q</sub> — оптична густина розчину порівняння, що містить хінін, виміряна за довжини хвилі 348 нм, коригована для концентрації 1 мг/1000 мл.

Вміст суми алкалоїдів (*x* + *y*), і відносний вміст алкалоїдів хінінного типу, обчислюють за формулою:

$$\frac{100x}{x + y}$$

## ЦЕНТЕЛА

## Centellae asiaticae herba

## CENTELLA

Висушені, фрагментовані надземні частини *Centella asiatica* (L.) Urban.

**Вміст:** не менше 6.0 % суми похідних тритерпеноїдів, у перерахунку на азіатікозид ( $C_{48}H_{78}O_{10}$ ; М.м. 959.15) і суху сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Листки дуже варіюють за розміром; черешок звичайно у 5-10, деколи у 15 разів довший за пластинку, що досягає від 10 мм до 40 мм завдовжки та від 20 мм до 40 мм, а деколи близько 70 мм завширшки.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Листки чергові, деколи зібрані разом у вузлах, ниркоподібні або округлі, або видовжено-еліптичні, з пальчастим жилкуванням, звичайно із 7 жилок та городчастим краєм. Молоді листки на нижній поверхні рідко опушені, а розвинені листки голі. Суцвіття, якщо воно наявне, простий зонтик, який звичайно складається із 3 квіток, рідше із 2 або 4; квітки дуже дрібні (близько 2 мм), п'ятичленні, мають нижню зав'язь; плід коричнювато-сірого кольору, округлий кремокарпій (вислоплідник), близько 5 мм завдовжки, дуже сплющений латерально та має від 7 до 9 виступаючих, викривлених ребер.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок зеленувато-сірого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин *хлоральгідрату Р*. У порошку виявляються: численні фрагменти епідерми листка із багатокутних клітин, вкритих безладно складчастою кутикулою, та продишових апаратів паразитного типу (2.8.3), що численніші в нижній епідермі; фрагменти епідерми черешка із видовжених клітин; однорядні, довгі, звивисті одноклітинні покривні волоски, зрідка багатоклітинні; молоді листки; спіральні судини; смолоносні канали; призми та здвоєні кристали кальцію оксалату близько 40 мкм у діаметрі; пучки вузькосептованих волокон зі стебла; фрагменти плоду; шари широкі клітин, розташованих у паркетному порядку; кільчасті судини. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин 50 % (об/об) *гліцерину Р*. У порошку виявляються клітини паренхіми із простими або складними крохмальними зернами.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробуваний розчин.** До 5.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 50 мл спирту

(30 % об/об) *Р*, нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником і центрифугують.

**Розчин порівняння.** 5 мг *азіатікозиду Р* розчиняють у *метанолі Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *Р*.

**Рухома фаза:** кислота оцтова *Р* - кислота мурашина *Р* - вода *Р* - етилацетат *Р* (11:11:27:100).

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином *анісового альдегіду Р* і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С, переглядають при денному світлі.

**Результати:** на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння у нижній третині має виявлятися зеленувато-блакитна зона (азіатікозид). На хроматорамі випробовуваного розчину нижче цієї зони також має виявлятися фіолетова зона (мадекасозид); близько фронту розчинника має виявлятися світло-блакитна зона (кислота азіатікова), і нижче неї рожевувато-фіолетова зона (кислота мадекасинова); у нижній половині мають виявлятися коричнева, сіра та коричнювато-зелена зони між лінією старту і зоною мадекасозиду та інші коричнювато-жовті або світло-жовті зони над зоною азіатікозиду.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 7 %, із яких не більше 5 % підземних органів і не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 12.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** 5.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) помішають у пакеті із фільтрувального паперу у апарат для безперервного екстрагування (типу Soxhlet), додають 100 мл *метанолу Р* і нагрівають протягом 8 год. Одержаний екстракт охолоджують і доводять *метанолом Р* до об'єму 100 мл і фільтрують крізь фільтр із розміром пор 0.45 мкм. Одержаний фільтрат доводять *метанолом Р* до об'єму 20.0 мл.

**Розчин порівняння.** 20.0 мг *азіатікозиду Р* розчиняють у *метанолі Р*, використовуючи, якщо необхідно,

ультразвук, та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4 мм,

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза *A*: ацетонітрил для хроматографії *P*,

— рухома фаза *B*: 3 мл кислоти фосфорної *P* доводять водою *P* до об'єму 1000 мл.

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0-65	22	78
65-66	55	45
66-76	95	5
76-85	22	78

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 200 нм.

**Об'єм інжекції:** 20 мкл.

**Відносні часи утримування до розчинника:** мадекасозиду — близько 5.8; азіатікозиду — близько 8.1; кислоти мадекасинової — близько 17.6; кислоти азіатікової — близько 21.7.

Коефіцієнт затримки ( $R_p$ ) азіатікозиду обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times V_1 \times 100}{m_1 \times HPLC_p}$$

де:

$A_1$  — площа піка азіатікозиду на хроматограмі розчину порівняння;

$V_1$  — об'єм розчину порівняння, у мілілітрах;

$m_1$  — маса азіатікозиду у розчині порівняння, у міліграмах;

$HPLC_p$  — хроматографічна чистота азіатікозиду.

Середнє значення коефіцієнта затримки ( $\overline{RF}$ ) азіатікозиду обчислюють за формулою:

$$\frac{\sum_{i=1}^N RF_i}{N}$$

де:

$\sum_{i=1}^N RF_i$  — сума коефіцієнтів затримки азіатікозиду на хроматограмах розчину порівняння;

$N$  — кількість інжекцій розчину порівняння (наприклад,  $N = 4$ ).

Вміст суми похідних тритерпеноїдів, у перерахунку на азіатікозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{V}{m} \left[ \frac{A + (B \times 1.017) + (C \times 0.526) + (D \times 0.509)}{RF} \right]$$

де:

$V$  — об'єм випробовуваного розчину, у мілілітрах;

$m$  — маса наважки субстанції у випробовуваному розчині, у міліграмах;

$A$  — площа піка азіатікозиду на хроматограмі випробовуваного розчину;

$B$  — площа піка мадекасозиду на хроматограмі випробовуваного розчину;

$C$  — площа піка кислоти мадекасинової на хроматограмі випробовуваного розчину;

$D$  — площа піка кислоти азіатікової на хроматограмі випробовуваного розчину;

$\overline{RF}$  — середнє значення коефіцієнта затримки азіатікозиду.

## ЦИТРОНЕЛОВА ОЛІЯ

### Citronellae aetheroleum

#### CITRONELLA OIL

Олія, одержана зі свіжих або частково висушених надземних частин *Cymbopogon winterianus* Jowitt. методом перегонки з водяною парою.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Від світло-жовтого до коричнево-жовтого кольору рідина із дуже сильним запахом цитронелалю.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**Перша ідентифікація:** В.

**Друга ідентифікація:** А.

**А.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 0.1 г цитронелової олії розчиняють у 10.0 мл 96 % спирту *P*.

**Розчин порівняння.** 20 мкл цитронелалю *P* розчиняють у 10 мл 96 % спирту *P*.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

**Рухома фаза:** етилацетат *P* - толуол *P* (10:90).

**Об'єм проби, що наноситься:** 5 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** близько 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** пластинку обприскують розчином анісового альдегіду *P* і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

**Шавлії листя**

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
цитронелаль: фіолетова зона	зона, подібна за кольором до зони цитронелалю  оранжева зона (цитронелол-гераніол)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

**В.** Переглядають хроматограми, одержані у випробуванні на хроматографічний профіль.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися характерні піки із тим самим часом утримування, що і на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину піки неролу та гераніолу можуть бути відсутніми.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Відносна густина (2.2.5).** Від 0.881 до 0.895.

**Показник заломлення (2.2.6).** Від 1.463 до 1.475.

**Оптичне обертання (2.2.7).** Від  $-4^\circ$  до  $+1.5^\circ$ .

**Хроматографічний профіль.** Газова хроматографія (2.2.28): метод внутрішньої нормалізації.

**Випробовуваний розчин.** Випробовувана субстанція.

**Розчин порівняння.** 25 мкл лимонену Р, 100 мкл цитронелалю Р, 25 мкл цитронеліацетату Р, 25 мкл цитралю Р, 25 мкл гераніацетату Р, 25 мкл цитронелолу Р і 100 мкл гераніолу Р розчиняють у 5 мл гексану Р.

**Колонка:**

- матеріал: кварц,
- розмір: 60 м × 0.25 мм,
- нерухома фаза: макрогол 20000 Р (0.2 мкм).

**Газ-носії:** гелій для хроматографії Р.

**Швидкість газу-носія:** 1.0 мл/хв.

**Поділ потоку:** 1:100.

**Температура:**

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 - 2	80
	2 - 26	80 → 150
	26 - 42	150 → 185
	42 - 49	185 → 250
Блок вводу проб		260
Детектор		260

**Детектор:** полуменево-іонізаційний.

**Об'єм інжекції:** 1 мкл розчину порівняння, 0.2 мкл випробовуваного розчину.

**Порядок виходу піків:** має відповідати порядку зазначення речовин у складі розчину порівняння. Відмічають часи утримування цих субстанцій.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 1.2 для піків гераніацетату та цитронелолу.

Використовуючи часи утримування, визначені із хроматограми розчину порівняння, визначають положення компонентів на хроматограмі випробовуваного розчину.

Визначають вміст кожного компонента, у відсотках.

**Вміст компонентів, у відсотках, має знаходитися у таких межах:**

- лимонен: від 1.0 % до 5.0 %,
- цитронелал: від 30.0 % до 45.0 %,
- цитронеліацетат: від 2.0 % до 4.0 %,
- нерал: менше 2.0 %,
- гераніал: менше 2.0 %,
- гераніацетат: від 3.0 % до 8.0 %,
- цитронелол: від 9.0 % до 15.0 %,
- гераніол: від 20.0 % до 25.0 %.

## ШАВЛІЇ ЛИСТЯ (SALVIA OFFICINALIS)

### Salviae officinalis folium

#### SAGE LEAF (SALVIA OFFICINALIS)

Цілі або різані, висушені листки *Salvia officinalis* L.

**Вміст:** не менше 15 мл/кг ефірної олії у цільній сировині та не менше 10 мл/кг ефірної олії у різаній сировині, у перерахунку на безводну сировину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Шавлії листя (*Salvia officinalis*) олія багата на туйон.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Пластинка цілого листка шавлії лікарської (*Salvia officinalis*) близько від 2 см до 10 см завдовжки та від 1 см до 2 см завширшки, видовжено-овальна або еліптична. Край від дрібно-городчастого до цільного. Верхівка заокруглена або дещо звужена, основа біля черешка зморшена, заокруглена або серцеподібна. Верхня поверхня зеленувато-сірого кольору та

дрібно чарункова; нижня поверхня білого кольору та вкрита густою сіткою виступаючих дрібних жилок.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355) (2.9.12). Порошок від світло-сірого до коричнювато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *розчин хлоральгідрату Р*. У порошку виявляються: дуже численні, членисті та зігнуті покривні волоски із вузьких, видовжених клітин і дуже товстостінних базальних клітин, а також фрагменти цих волосків: фрагменти верхньої епідерми із пористих, майже багатокутних клітин; фрагменти нижньої епідерми із клітин зі звивистими оболонками та численних продихових апаратів діацитного типу (2.8.3); зрідка поодинокі головчасті залозисті волоски із одно- або двоклітинною голівкою та ніжкою із від 1 до 4 клітин; численні ефіроолійні залозки із одноклітинною ніжкою та голівкою із 8 радіально розташованих клітин із піднятою спільною кутикулою.

**С.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 0.5 г свіжоздрібненої сировини (355) (2.9.12) струшують із 5 мл 96 % спирту *Р* протягом 5 хв.

*Розчин порівняння.* 20 мкл туйону *Р* і 25 мкл цинеолу *Р* розчиняють у 20 мл 96 % спирту *Р*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю *Р*.

*Рухома фаза:* етилацетат *Р* - толуол *Р* (5:95).

*Об'єм проби, що наноситься:* 20 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* пластинку обприскують розчином 200 г/л кислоти фосфорномолібденової *Р* у 96 % спирті *Р*, нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв. Переглядають при денному світлі.

*Результати:* нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	синя зона (близько фронту розчинника)
$\alpha$ -туйон і $\beta$ -туйон: 2 рожевувато-фіолетові зони	2 рожевувато-фіолетові зони ( $\alpha$ -туйон і $\beta$ -туйон)
цинеол: синя зона	синя зона (цинеол)
	сині зони
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

## ВИПРОБУВАННЯ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 3 % стебел і не більше 2 % інших сторонніх домішок.

**Вода (2.2.13).** Не більше 100 мл/кг, визначення проводять із 20.0 г сировини.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Проводять визначення вмісту ефірної олії (2.8.12). Використовують 20.0 г сировини, різаної, якщо необхідно, безпосередньо перед випробовуванням, колбу місткістю 500 мл, 250 мл води *Р* як дистиляційну рідину і 0.5 мл ксилолу *Р* у градуйованій трубі. Перегонку проводять зі швидкістю від 2 мл/хв до 3 мл/хв протягом 2 год.

## ШАВЛІЇ НАСТОЙКА

### Salviae tinctura

#### SAGE TINCTURE

Настойка, одержана із сировини, описаної у статті «Шавлії листя (*Salvia officinalis*)».

*Вміст:* не менше 0.1 % м/м ефірної олії.

#### ВИРОБНИЦТВО

Настойку одержують із 1 частини здрібненої сировини і 10 частин спирту (70 % об/об) підходящим методом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Рідина коричнюватою кольору із характерним запахом.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Випробовувана настойка.

*Розчин порівняння.* 20 мкл туйону *Р* і 25 мкл цинеолу *Р* розчиняють у 20 мл 96 % спирту *Р*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю *Р*.

*Рухома фаза:* етилацетат *Р* - толуол *Р* (5:95).

## Шавлії настійка

**Об'єм проби, що наноситься:** 20 мкл, смугами.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** обприскують розчином 200 г/л фосфорно-молібденової кислоти *P* у 96 % спирті *P* і нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв; переглядають при денному світлі.

**Результати:** нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися інші зони.

Верхня частина пластинки	
	блакитна зона (близько фронту розчинника)
$\alpha$ -туйон і $\beta$ -туйон: 2 рожевувато-фіолетові зони	2 рожевувато-фіолетові зони ( $\alpha$ -туйон і $\beta$ -туйон)
цинеол: синя зона	синя зона (цинеол)
	сині зони
<b>Розчин порівняння</b>	<b>Випробовуваний розчин</b>

## ВИПРОБУВАННЯ

**Етанол (2.9.10).** Від 64 % (об/об) до 69 % (об/об).

**Метанол і 2-пропанол (2.9.11).** Не більше 0.05 % (об/об) метанолу, не більше 0.05 % 2-пропанолу.

**Сухий залишок (2.8.16).** Не менше 2.0 % (м/м), визначення проводять із 3.00 г.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

30.0 г настійки поміщають у круглодонну колбу місткістю 500 мл і додають 100 мл води *P*, переганяють, використовуючи холодильник, у ділительну лійку, на яку попередньо була нанесена позначка 50 мл. Перегонку припиняють, коли рівень дистиляту досягне позначки 50 мл. Холодильник обполіскують 10 мл пентану *P*. У дистиляті розчиняють достатню для одержання насиченого розчину кількість натрію хлориду *P*. Струшують із 3 порціями, по 20 мл кожна, пентану *P*. Об'єднані пентанові шари висушують, включаючи пентан, що використовували для обполіскування холодильника, над натрію сульфатом безводним *P* і фільтрують крізь тампон із вати у попередньо зважену круглодонну колбу місткістю 100 мл. Натрію сульфат промивають декілька разів невеликими кількостями пентану *P*. Пентан обережно видаляють при температурі не вище 40 °С. Залишок висушують в ексікаторі над фосфору(V)оксидом *P* і парафіном при атмосферному тиску та при кімнатній температурі протягом 2 год. Залишок зважують (ефірна олія).

# ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΪ



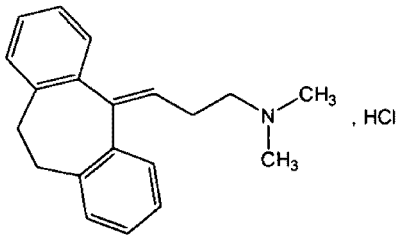


## A

## АМІТРИПТИЛІНУ ГІДРОХЛОРИД

## Amitriptylini hydrochloridum

## AMITRIPTYLINE HYDROCHLORIDE



$C_{20}H_{24}ClN$   
[549-18-8]

М.м. 313.9

3-(10,11-Дигідро-5H-добензо[*a,d*][7]анулен-5-іліден)-*N,N*-диметилпропан-1-амін гідрохлорид.

*Вміст:* від 99.0 % до 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Порошок білого або майже білого кольору або безбарвні кристали.

*Розчинність.* Легко розчинний у воді *P*, 96 % спирті *P* і метиленхлориді *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

■

**A.** Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ амітриптиліну гідрохлориду.

■

**B.** 20 мг субстанції дають реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

*Прозорість розчину* (2.2.1). 1.25 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим роз-

чинником до 25 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

*Кольоровість розчину* (2.2.2, метод *II*). Забарвлення розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину», має бути не інтенсивнішим за еталон *B*<sub>7</sub>.

*Кислотність або лужність.* 0.20 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. До одержаного розчину додають 0.1 мл розчину метилового червоного *P* і 0.2 мл 0.01 *M* розчину натрію гідроксиду; з'являється жовте забарвлення, що має перейти у червоне при додаванні 0.4 мл 0.01 *M* розчину кислоти хлористоводневої.

▼ *Супровідні домішки.* Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 50.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 5.0 мг ФСЗ дибензосуберону (домішка *A*) і 5.0 мг ФСЗ циклобензаприну гідрохлориду (домішка *B*) розчиняють у 5.0 мл випробовуваного розчину та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 1.0 мл розчину порівняння (а) доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм;

— *нерухома фаза:* полімер кремнієорганічний аморфний октадецилсилільний ендкепований із полярною вставкою *P* (5 мкм);

— температура: 40 °С.

*Рухома фаза:* ацетонітрил *P* - розчин 5.23 г/л дикалію гідрофосфату *P*, рН якого попередньо доводять кислотою фосфорною *P* до 7.0, (35:65).

*Швидкість рухомої фази:* 1.2 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

*Об'єм інжекції:* 10 мкл.

*Час хроматографування:* у 3 рази більше часу утримування амітриптиліну.

Відносні часи утримування до амітриптиліну (час утримування амітриптиліну близько 14 хв): домішки В — близько 0.9; домішки А — близько 2.2.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (а):

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків домішки В і амітриптиліну.

Нормування:

— домішка В: площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.1 %),

— домішка А: площа піка не має перевищувати 0.5 площі відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %),

— неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу піка амітриптиліну на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.10 %),

— сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 3 площі піка амітриптиліну на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.3 %),

— не враховують: піки, площа яких менше 0.5 площі піка амітриптиліну на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %).▲

**Важкі метали (2.4.8, метод F).** Не більше 0.002 % (20 ppm). 1.0 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 2 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °C протягом 2 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.250 г субстанції розчиняють у 30 мл 96 % спирту P і титрують 0.1 M розчином натрію гідроксиду потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0.1 M розчину натрію гідроксиду відповідає 31.39 мг  $C_{20}H_{24}ClN$ .

## ЗБЕРІГАННЯ

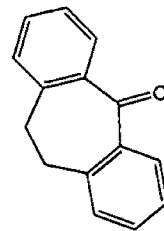
У захищеному від світла місці.

## ДОМІШКИ

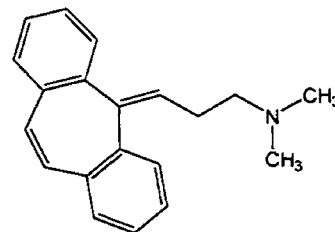
▼ Специфіковані домішки: А, В.

Інші домішки, що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування».

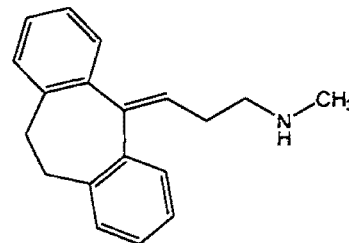
Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»: С, D, E, F, G.▲



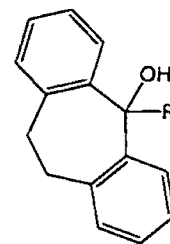
А. 10,11-дигідро-5H-добензо[а, d][7]анулен-5-он (добензосуберон),



В. 3-(5H-добензо[а, d][7]анулен-5-іліден)-N,N-диметилпропан-1-амін (циклобензаприн),

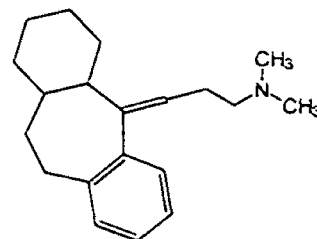


С. 3-(10,11-дигідро-5H-добензо[а, d][7]анулен-5-іліден)-N-метилпропан-1-амін (нортриптилін),

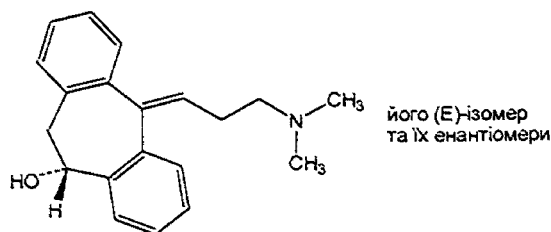


D. R =  $CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$ : 5-[3-(диметиламіно)пропіл]-10,11-дигідро-5H-добензо[а, d][7]анулен-5-ол,

G. R = H: 10,11-дигідро-5H-добензо[а, d][7]анулен-5-ол (добензосуберол),



Е. N,N-диметил-3-(1,2,3,4,4а, 10,11,11а-октагідро-5H-добензо[а, d][7]анулен-5-іліден)пропан-1 амін,

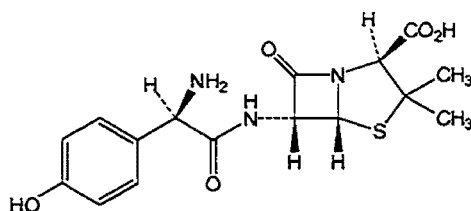


Ф. (5*EZ*, 10*RS*)-5-[3-(диметиламіно)пропіліден]-10,11-дигідро-5*H*-добензо[*a,d*][7]анулен-10-ол.

## АМОКСИЦИЛІН НАТРІЮ

### Amoxicillinum natricum

#### AMOXICILLIN SODIUM



$C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$   
[34642-77-8]

М.м. 387.4

Натрію (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)-ацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло-[3.2.0]гептан-2-карбоксілат.

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

*Вміст:* від 89.0 % до 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Порошок білого або майже білого кольору. Дуже гігроскопічний.

*Розчинність.* Дуже легко розчинний у воді *P*, помірно розчинний в етанолі *P*, дуже мало розчинний в ацетоні *P*.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*Перша ідентифікація:* А, Д.

*Друга ідентифікація:* В, С, Д.

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Приготування зразка:* 0.250 г субстанції розчиняють у 5 мл води *P*, додають 0.5 мл кислоти оцтової

розведеної *P*, перемішують і витримують у льодяній бані протягом 10 хв. Одержані кристали фільтрують, промивають 2-3 мл суміші вода *P* - ацетон *P* (1:9) і сушать при температурі 60 °С протягом 30 хв.

*Відповідність:* спектру ФСЗ амоксициліну тригідрату.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 25 мг субстанції розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату *P*.

*Розчин порівняння (а).* 25 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату *P*.

*Розчин порівняння (b).* 25 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату та 25 мг ФСЗ ампіциліну тригідрату розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату *P*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

*Рухома фаза:* суміш ацетон *P* - розчин 154 г/л амонію ацетату *P*, рН якого попередньо доводять до 5.0 кислотою оцтовою льодяною *P* (10:90).

*Об'єм проби, що наноситься:* 1 мкл.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* пластинку витримують у парі йоду до виявлення плям і переглядають при денному світлі.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

С. Близько 2 мг субстанції помішають у пробірку близько 150 мм завдовжки та близько 15 мм у діаметрі та змочують 0.05 мл води *P*. Потім додають 2 мл розчину формальдегіду у кислоті сірчаній *P* і перемішують обертальними рухами; розчин має бути практично безбарвним. Пробірку нагрівають у водяній бані протягом 1 хв; з'являється темно-жовте забарвлення.

Д. Субстанція дає реакцію (а) на натрій (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ

*Прозорість розчину (2.2.1).* 1.0 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл. Розчин використовують відразу після приготування.

Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон ІІ.

**Кольоровість розчину.** Розчин приготований для випробування «Прозорість розчину», відразу після приготування має рожеве забарвлення, що швидко зникає. Оптична густина (2.2.25), виміряна через 5 хв після приготування розчину за довжини хвилі 430 нм, не має перевищувати 0.20.

**pH (2.2.3).** Від 8.0 до 10.0.

2.0 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду; Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

**Питоме оптичне обертання (2.2.7).** Від +240° до +290°, у перерахунку на безводну речовину.

62.5 мг субстанції розчиняють у розчині 4 г/л калію гідрофталату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин (а).** 30.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин (б).** 30.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 20.0 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

**Розчин порівняння (а).** 30.0 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Розчин порівняння (б).** 4.0 мг ФСЗ цефадроксилу розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50 мл. До 5.0 мл одержаного розчину додають 5.0 мл розчину порівняння (а) та доводять рухомою фазою А до об'єму 100 мл.

**Розчин порівняння (с).** 2.0 мл розчину порівняння (а) доводять рухомою фазою А до 20.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 20.0 мл.

**Розчин порівняння (д).** До 0.20 г амоксициліну тригідрату Р додають 1.0 мл води Р, струшують і додають краплями розчин натрію гідроксиду розведений Р до одержання розчину. рН одержаного розчину має бути близько 8.5. Розчин витримують при кімнатній температурі протягом 4 год. 0.5 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: суміш ацетонітрил Р - розчин 25 % (об/об) 0.2 М розчину калію дигідрофосфату, рН якого доводять до 5.0 розчином натрію гідроксиду розведеним Р, (1:99);

— рухома фаза В: суміш ацетонітрил Р - розчин 25 % (об/об) 0.2 М розчину калію дигідрофосфату, рН якого доводять до 5.0 розчином натрію гідроксиду розведеним Р, (20:80);

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	92	8
$t_R - (t_R + 25)$	92 → 0	8 → 100
$(t_R + 25) - (t_R + 40)$	0	100
$(t_R + 40) - (t_R + 55)$	92	8

$t_R$  — час утримування амоксициліну, визначений при хроматографуванні розчину порівняння (с).

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 50 мкл розчинів порівняння (b) і (с) в ізокротичному режимі за вихідного складу рухомої фази, 50 мкл випробовуваного розчину (b) і розчину порівняння (d) у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

**Ідентифікація домішок:** використовують хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації 3 основних піків, що елюються після основного піка, і що відповідають домішці С, амоксициліну димеру (домішка J;  $n = 1$ ) й амоксициліну тримеру (домішка J;  $n = 2$ )

**Відносні часи утримування до амоксициліну:** домішки С — близько 3.4; домішки J ( $n = 1$ ) — близько 4.1; домішки J ( $n = 2$ ) — близько 4.5.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків амоксициліну та цефадроксилу, якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А і В.

**Нормування:**

— домішка J ( $n = 1$ ): площа піка має становити не більше 3 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (3 %);

— будь-яка інша домішка: площа піка кожної домішки має становити не більше 2 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (2 %);

— сума домішок: сума площ піків має становити не більше 9 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (9 %);

— не враховують: піки, площа яких становить 0.1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (0.1 %)

**N,N-Диметиланілін (2.4.26, метод А або В).** Не більше 0.002 % (20 ppm).

**2-Етилгексанова кислота (2.4.28).** Не більше 0.8 (м/м).

**Важкі метали (2.4.8, метод С).** Не більше 0.002 % (20 ppm). 1.0 г субстанції має витримувати ви-

пробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 2 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р.

Вода (2.5.12). Не більше 3.0 %. Визначення проводять із 0.400 г субстанції.

Бактеріальні ендотоксини (2.6.14). Менше 0.25 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Супровідні домішки», із такими змінами.

Рухома фаза: вихідний склад суміші рухомих фаз А та В, змінений, якщо необхідно.

Інжекції: випробовуваний розчин (а), розчин порівняння (а).

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (а):

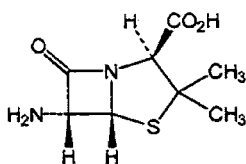
— збіжність: відносне стандартне відхилення після 6 інжекцій має становити не більше 1.0 %.

Вміст амоксициліну натрію, у відсотках, обчислюють шляхом множення вмісту амоксициліну, у відсотках, на 1.060.

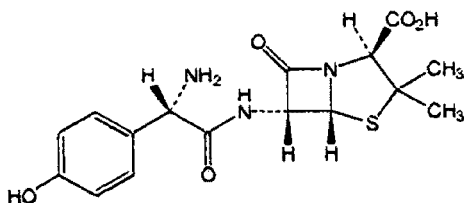
## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття.

## ДОМІШКИ

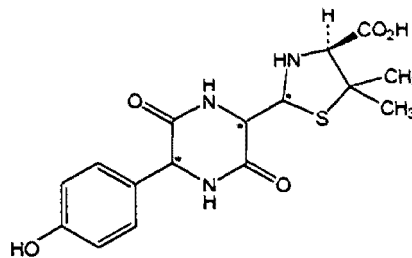


А. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-аміно-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6-амінопеніциланова кислота),

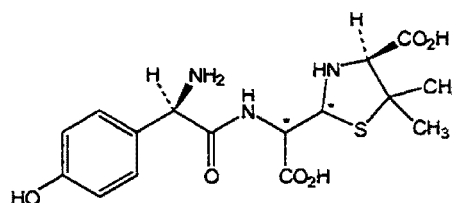


В. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[2*S*]-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)ацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабі-

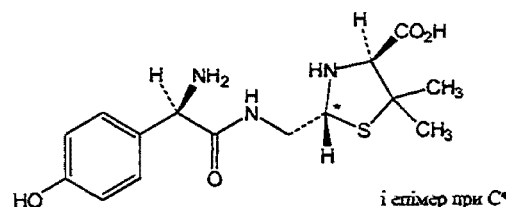
цикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (L-амоксицилін),



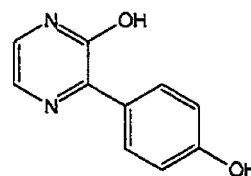
С. (4*S*)-2-[5-(4-гідроксифеніл)-3,6-діоксопіперазин-2-іл]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (амоксициліну дикетопіперазини),



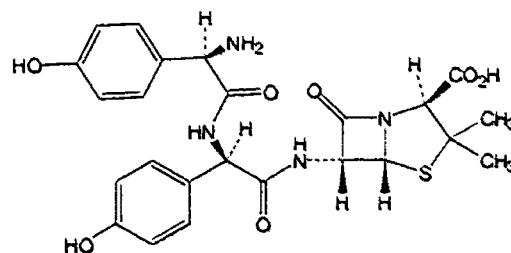
Д. (4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)ацетил]аміно]метил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пеніцилоїнові кислоти амоксициліну),



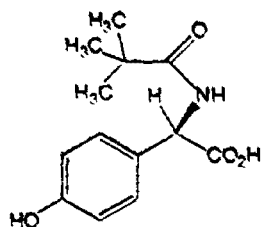
Е. (2*RS*,4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)ацетил]аміно]метил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пенілоїнові кислоти амоксициліну),



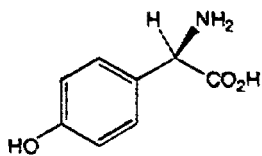
Ф. 3-(4-гідроксифеніл)піразин-2-ол,



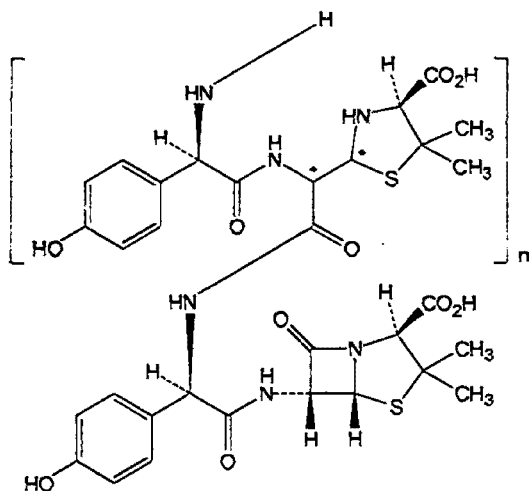
Г. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-[(2*R*)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)ацетил]аміно]-2-(4-гідроксифеніл)ацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (D-(4-гідроксифеніл)гліциламоксицилін),



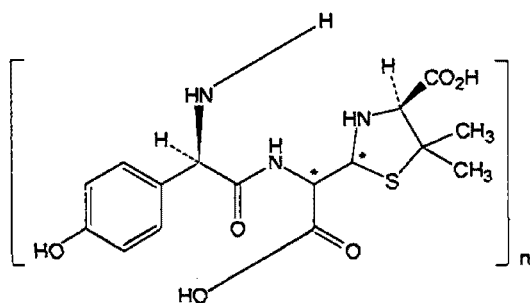
Н. (2*R*)-2-[(2,2-диметилпропанойл)аміно]-2-(4-гідроксифеніл)оцтова кислота.



І. (2*R*)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл)оцтова кислота.



Ж. ко-олігомери амоксициліну та пеніцилоїнових кислот амоксициліну.

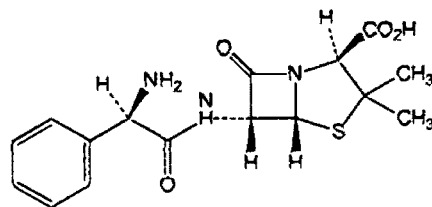


К. олігомери пеніцилоїнових кислот амоксициліну.

## АМПІЦИЛІН БЕЗВОДНИЙ

Ampicillinum anhydricum

AMPICILLIN, ANHYDROUS



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$   
[69-53-4]

М.м. 349.4

(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота.

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

Вміст: не менше 96.0 % і не більше 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Помірно розчинний у воді *P*, практично не розчинний в ацетоні *P*, 96 % спирті *P* і жирних оліях.

(Розчиняється в розведених розчинах кислот і гідроксидів лужних металів.)

(Виявляє поліморфізм (5.9).)

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, Д.

Друга ідентифікація: В, С, Д.

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Підготування зразка: субстанцію досліджують у дисках із калію бромідом *P*.

Відповідність: спектру ФСЗ ампіциліну безводного.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 25 мг субстанції розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату *P*.

Розчин порівняння (а). 25 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату *P*.

**Розчин порівняння (b).** 25 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату і 25 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю силанізованого Р.

**Рухома фаза:** ацетон Р - розчин 154 г/л амонію ацетату Р, рН якого доведено до 5.0 кислотою оцтовою льодяною Р, (10:90).

**Об'єм проби, що наноситься:** 1 мкл.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** пластинку витримують у парі йоду до виявлення плям і переглядають при денному світлі.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— на хроматограмі виявляються дві чітко розділені плями.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**С.** Близько 2 мг субстанції поміщають у пробірку близько 150 мм заввишки та 15 мм у діаметрі та змочують 0.05 мл води Р. Потім додають 2 мл розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р і перемішують обертальними рухами; одержаний розчин має бути практично безбарвним. Пробірку нагрівають у водяній бані протягом 1 хв; з'являється темно-жовте забарвлення.

**Д.** Субстанція має відповідати вимогам щодо вмісту води, зазначеним у розділі «Випробування».

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 1.0 г субстанції розчиняють у 10 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої. Окремо 1.0 г субстанції розчиняють у 10 мл розчину аміаку розведеного Р2. Одержані розчини відразу після приготування за ступенем каламутності не мають перевищувати еталон ІІ.

**рН (2.2.3).** Від 3.5 до 5.5. 0.1 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 40 мл.

**Питоме оптичне обертання (2.2.7).** Від +280° до +305°, у перерахунку на безводну речовину. 62.5 мг субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин (a).** 27.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А і доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин (b).** 27.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А і доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 10.0 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

**Розчин порівняння (a).** 27.0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у рухомій фазі А і доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 2 мг ФСЗ цефрадину розчиняють у рухомій фазі А і доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50 мл. До 5.0 мл одержаного розчину додають 5.0 мл розчину порівняння (a).

**Розчин порівняння (c).** 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять рухомою фазою А до об'єму 20.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 50 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000 мл;

— рухома фаза В: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 400 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000 мл;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	85	15
$t_R - (t_R + 30)$	85 → 0	15 → 100
$(t_R + 30) - (t_R + 45)$	0	100
$(t_R + 45) - (t_R + 60)$	85	15

$t_R$  — час утримування ампіциліну, визначений при хроматографуванні розчину (c).

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 50 мкл розчину порівняння (b) і 50 мкл розчину порівняння (c) в ізократичному режимі за вихідного складу рухомої фази, 50 мкл випробовуваного розчину (b) у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухома фаза А у градієнті.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— коефіцієнт розділення: не менше 3.0 для піків ампіциліну та цефрадину; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А і В.

**Нормування:**

— будь-яка домішка: площа піка домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (1.0 %).



*N,N*-Диметиланілія (2.4.26, метод В). Не більше 0.002 % (20 ppm).

Вола (2.5.12). Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 0.300 г субстанції.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.5 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у розділі «Супровідні домішки», із такими змінами.

*Рухома фаза*: вихідний склад суміші рухомих фаз А та В, змінений, якщо необхідно.

*Інжекції*: випробовуваний розчин (а), розчин порівняння (а).

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (а):

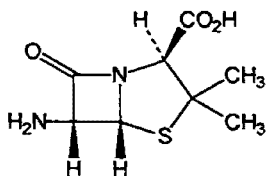
— *збіжність*: відносне стандартне відхилення після 6 інжекцій має становити не більше 1.0 %.

Вміст ампіциліну, у відсотках, обчислюють, використовуючи вміст ампіциліну у *ФСЗ ампіциліну безводного*.

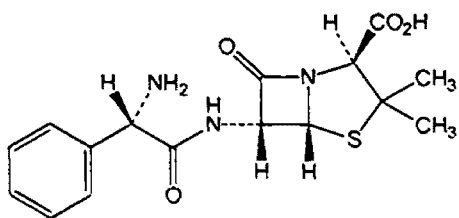
### ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, при температурі не вище 30 °С.

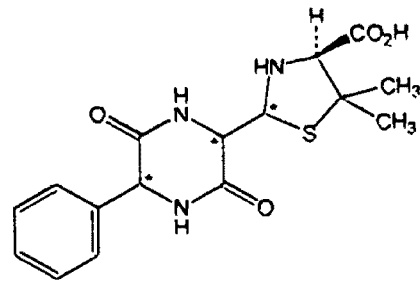
### ДОМІШКИ



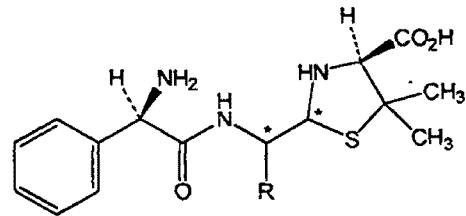
**A.** (2*S*,5*R*,6*R*)-6-аміно-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6-амінопеніциланова кислота).



**B.** (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*S*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (L-ампіцилін).

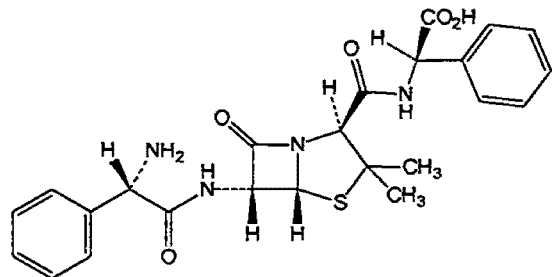


**C.** (4*S*)-2-(3,6-діоксо-5-фенілпіперазин-2-іл)-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (дикетопіперазини ампіциліну),

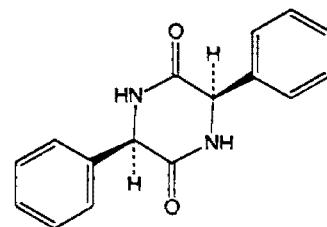


**D.** R=CO<sub>2</sub>H : (4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]карбоксиметил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пеніцилоїнові кислоти ампіциліну),

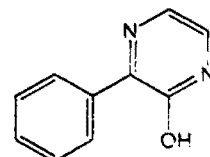
**F.** R=H : (2*RS*,4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]метил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пенілоїнові кислоти ампіциліну),



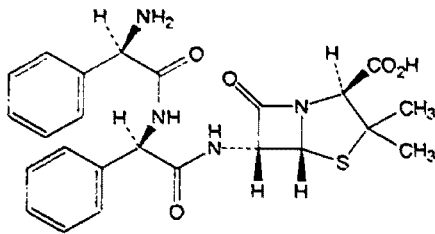
**E.** (2*R*)-2-[[[(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гепт-2-іл]карбоніл]аміно]-2-фенілоцтова кислота (ампіцилін-D-фенілгліцин).



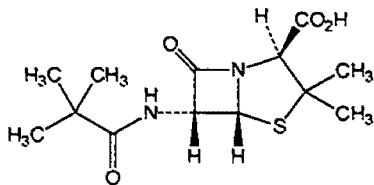
**G.** (3*R*,6*R*)-3,6-дифенілпіперазин-2,5-діон.



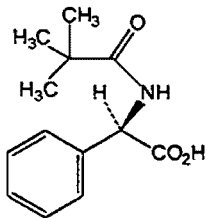
**H.** 3-фенілпіперазин-2-ол.



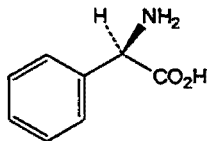
I. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (D-фенілгліцилампіцилін).



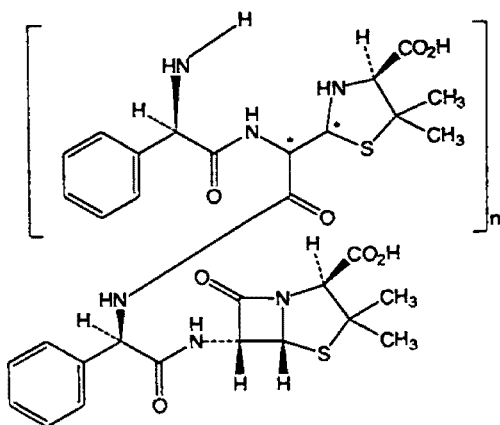
J. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2,2-диметилпропаноїл)аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота,



K. (2*R*)-2-[(2,2-диметилпропаноїл)аміно]-2-фенілоцтова кислота,



L. (2*R*)-2-аміно-2-фенілоцтова кислота (D-фенілгліцин),

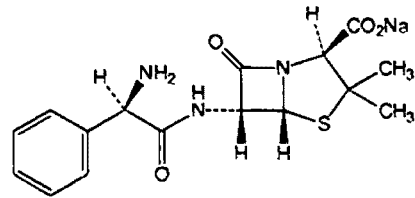


M. ко-олігомери ампіциліну та пеніцилоїнових кислот ампіциліну.

## ▲АМПІЦИЛІН НАТРІЮ▲

Ampicillinum natricum

AMPICILLIN SODIUM



$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$   
[69-52-3]

М.м. 371.4

Натрію (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбоксилат.

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

Вміст: не менше 91.0 % і ▼ не більше 102.0 % ▲, у перерахунку на безводну речовину.

### ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Порошок білого ▼ або майже білого ▲ кольору. Гігроскопічний.

Розчинність. Легко розчинний у воді P, помірно розчинний в ацетоні P, практично не розчинний у жирних оліях і вазеліновому маслі.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, D.

Друга ідентифікація: В, С, D.

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Приготування зразка: 0.250 г субстанції розчиняють у 5 мл води P, додають 0.5 мл кислоти оцтової розведеної P, перемішують і витримують у льодяній бані протягом 10 хв. Одержані кристали фільтрують крізь невеликий скляний фільтр (40) (2.1.2) під вакуумом, промивають 2-3 мл суміші вода P - ацетон P (1:9) і сушать при температурі 60 °С протягом 30 хв.

Відповідність: спектру ФСЗ ампіциліну тригідрату.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 25 мг субстанції розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату P.

Розчин порівняння (а). 25 мг ФСЗ ампіциліну тригідрату розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату P.

## Ампіцилін натрію

**Розчин порівняння (b).** 25 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату та 25 мг ФСЗ ампіциліну тригідрату розчиняють у 10 мл розчину натрію гідрокарбонату Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** суміш ацетон Р - розчин 154 г/л амонію ацетату Р, рН якого попередньо доведено до 5.0 кислотою оцтовою льодяною Р (10:90).

**Об'єм проби, що наноситься:** 1 мкл.

**Відстань, що має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** пластинку витримують у парі йоду до виявлення плям і переглядають при денному світлі.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**С.** Близько 2 мг субстанції поміщають у пробірку близько 150 мм завдовжки та близько 15 мм у діаметрі та змочують 0.05 мл води Р. Потім додають 2 мл розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р і перемішують обертальними рухами; розчин має бути практично безбарвним. Пробірку нагрівають у водяній бані протягом 1 хв; з'являється темно-жовте забарвлення.

**D.** Субстанція дає реакцію (a) на натрій (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 1.0 г субстанції поміщають у конічну колбу та повільно, при постійному перемішуванні додають 10 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої (розчин А). 1.0 г субстанції окремо розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл (розчин В). Розчини використовують відразу після приготування. Розчини А і В за ступенем каламутності не мають перевищувати еталон ІІ.

**Кольоровість розчину.** Оптична густина (2.2.25) розчину В, приготованого для випробування «Прозорість розчину», виміряна відразу після приготування за довжини хвилі 430 нм, не має перевищувати 0.15.

**рН (2.2.3).** Від 8.0 до 10.0. 2.0 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл. Визначення проводять через 10 хв після приготування розчину.

**Питоме оптичне обертання (2.2.7).** Від +258° до +287°, у перерахунку на безводну речовину.

62.5 мг субстанції розчиняють у розчині 4 г/л калію гідрофталату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

► **Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин (a).** 31.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин (b).** 31.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 10.0 мл. *Розчин готують безпосередньо перед використанням.*

**Розчин порівняння (a).** 27.0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 2.0 мг ФСЗ цефрадіну розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50 мл. До 5.0 мл одержаного розчину додають 5.0 мл розчину порівняння (a).

**Розчин порівняння (c).** 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять рухомою фазою А до об'єму 20.0 мл.

**Розчин порівняння (d).** До 0.20 г субстанції додають 1.0 мл води Р і нагрівають при температурі 60 °С протягом 1 год. 0.5 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

**Колонка:**

— **розмір:** 0.25 м × 4.6 мм;

— **нерухома фаза:** силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— **рухома фаза А:** суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 50 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000 мл;

— **рухома фаза В:** суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 400 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000 мл;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	85	15
$t_R - (t_R + 30)$	85 → 0	15 → 100
$(t_R + 30) - (t_R + 45)$	0	100
$(t_R + 45) - (t_R + 60)$	85	15

$t_R$  — час утримання ампіциліну, визначений при хроматографуванні розчину порівняння (c).

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 50 мл розчинів порівняння (b) і (c) в ізократичному режимі за вихідного складу рухомої фази, 50 мл випробовуваного розчину (b) і розчину порівняння (d) у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

**Ідентифікація піків:** використовують хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації піків ампіциліну та ампіциліну димеру.

**Відносні часи утримування до ампіциліну:** ампіциліну димеру — близько 2.8.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— **коефіцієнт розділення:** не менше 3.0 для піків ампіциліну та цефрадину, якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А і В.

**Нормування:**

— **ампіциліну димер:** площа піка має становити не більше 4.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (4.5 %);

— **будь-яка інша домішка:** площа піка кожної домішки має становити не більше 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (2 %)▲.

**N,N-Диметиланілін** (2.4.26, метод В). Не більше 0.002 % (20 ppm).

**2-Етилгексанова кислота** (2.4.28). Не більше 0.8 % (m/m).

**Метиленхлорид.** Газова хроматографія (2.2.28).

**Розчин внутрішнього стандарту.** 1.0 мл етиленхлориду Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл.

**Випробовуваний розчин (a).** 1.0 г субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

**Випробовуваний розчин (b).** 1.0 г субстанції розчиняють у воді Р, додають 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту та доводять об'єм розчину водою Р до 10.0 мл.

**Розчин порівняння.** 1.0 мл метиленхлориду Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл. До 1.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл розчину внутрішнього стандарту та доводять об'єм розчину водою Р до 10.0 мл.

**Колонка:**

— **матеріал:** скло;

— **розмір:** 1.5 м × 4 мм;

— **нерухома фаза:** діатоміт для газової хроматографії Р, імпрегнований 10 % (m/m) макрогелу 1000 Р.

**Газ-носії:** азот для хроматографії Р.

**Лінійна швидкість газу-носія:** 40 мл/хв.

**Температура:**

— **колони:** 60 °С;

— **блока вводу проб:** 100 °С;

— **детектора:** 150 °С.

**Детектор:** полуменево-іонізаційний.

Вміст метиленхлориду, у відсотках, обчислюють, використовуючи в'язкість при температурі 20 °С, що дорівнює 1.325 г/мл.

**Нормування:**

— **метиленхлорид:** не більше 0.2 % (m/m).

**Важкі метали** (2.4.8, метод С). Не більше 0.002 % (20 ppm). 1.0 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 2 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р.

**Вода** (2.5.12). Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 0.300 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Менше 0.15 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## ▼ КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Супровідні домішки», із такими змінами.

**Рухома фаза:** вихідний склад суміші рухомих фаз А та В, змінений, якщо необхідно.

**Інжекції:** випробовуваний розчин (a), розчин порівняння (a).

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (a):

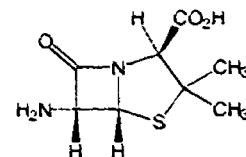
— **збіжність:** відносне стандартне відхилення після 6 інжекцій має становити не більше 1.0 %.

Вміст ампіциліну натрію, у відсотках, обчислюють шляхом множення вмісту ампіциліну, у відсотках, на 1.063.▲

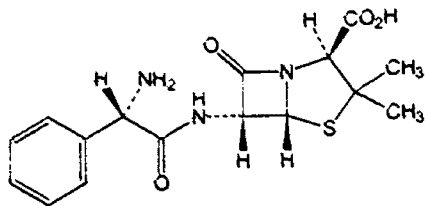
## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття.

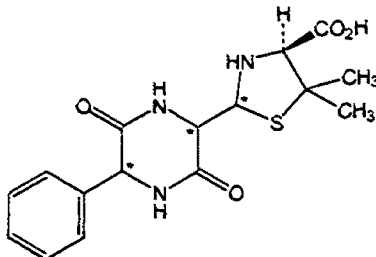
## ДОМІШКИ



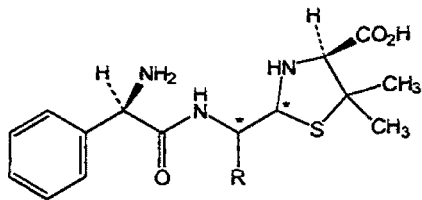
А. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-аміно-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6-амінопеніциланова кислота),



**В.** (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*S*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (L-ампіцилін),

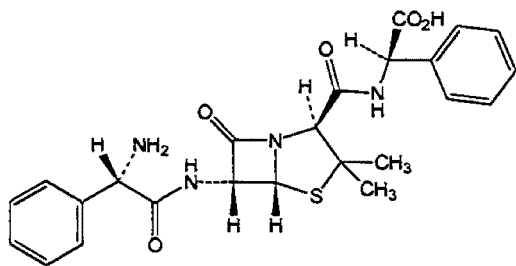


**С.** (4*S*)-2-(3,6-діоксо-5-фенілпіперазин-2-іл)-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (ампіциліну дикетопіперазини),

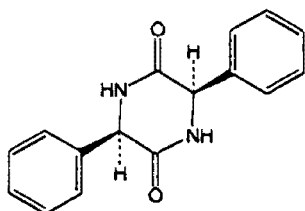


**D.** R = CO<sub>2</sub>H: (4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]карбоксиметил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пеніцилоїнові кислоти ампіциліну),

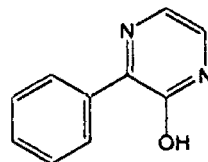
**F.** R = H: (2*R*,4*S*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]метил]-5,5-диметилтіазолідин-4-карбонова кислота (пенілоїнові кислоти ампіциліну),



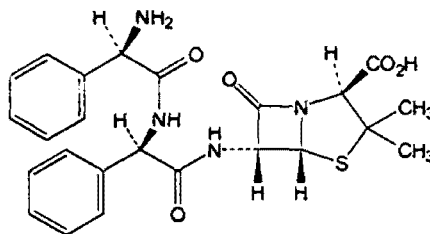
**E.** (2*R*)-2-[[[(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гепт-2-іл]карбоніл]аміно]-2-фенілоцтова кислота (ампіцилін-D-фенілгліцин),



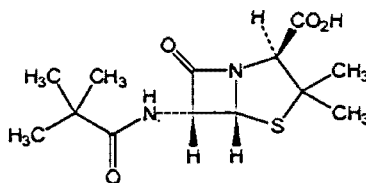
**G.** (3*R*,6*R*)-3,6-дифенілпіперазин-2,5-діон,



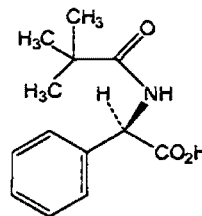
**H.** 3-фенілпіразин-2-ол,



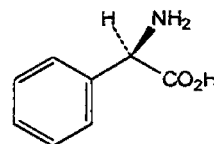
**I.** (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-[[[(2*R*)-2-аміно-2-фенілацетил]аміно]-2-фенілацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (D-фенілгліцилампіцилін),



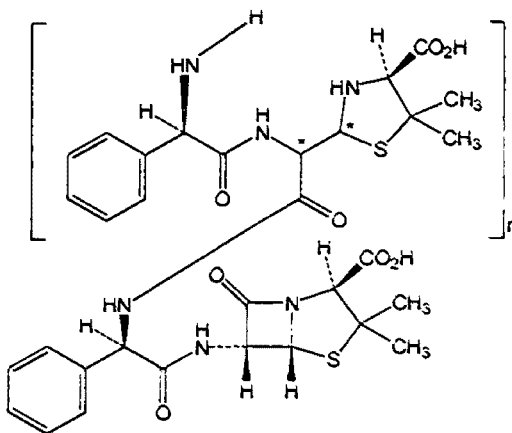
**J.** (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2,2-диметилпропаноїл)аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота,



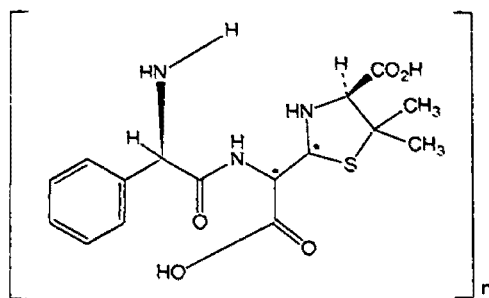
**K.** (2*R*)-2-[(2,2-диметилпропаноїл)аміно]-2-фенілоцтова кислота,



**L.** (2*R*)-2-аміно-2-фенілоцтова кислота (D-фенілгліцин),



**M.** ко-олігомери ампіциліну та пеніцилоїнових кислот ампіциліну,

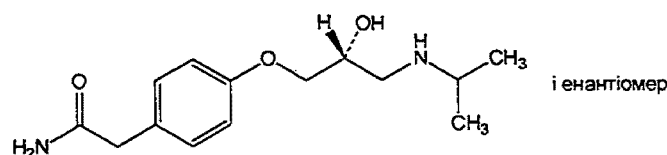


N. олігомери пеніцилоїнових кислот ампіциліну.

## АТЕНОЛОЛ

### Atenololum

#### ATENOLOL



і енантіомер

$C_{14}H_{22}N_2O_3$   
[29122-68-7]

М.м. 266.3

2-[4-[(2*RS*)-2-Гідрокси-3-[(1-метилетил)аміно]пропокси]феніл]ацетамід. ▲

*Вміст:* не менше 99.0 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Порошок білого або майже білого кольору.

*Розчинність.* Помірно розчинний у воді *P*, розчинний в етанолі *P*, мало розчинний у метиленхлориді *P*.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*Перша ідентифікація:* С.

*Друга ідентифікація:* А, В, D.

*А.* Температура плавлення (2.2.14). Від 152 °С до 155 °С.

*В.* Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* 0.100 г субстанції розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим

розчинником до 100 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100 мл.

*Область довжин хвиль:* від 230 нм до 350 нм.

*Абсорбційні максимуми:* за довжин хвиль 275 нм і 282 нм.

*Відношення оптичних густин:*  $A_{275}/A_{282}$ : від 1.15 до 1.20.

*С.* Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ атенололу.

*Д.* Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* 10 мг субстанції розчиняють в 1 мл метанолу *P*.

*Розчин порівняння.* 10 мг ФСЗ атенололу розчиняють в 1 мл метанолу *P*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю силанізованого  $F_{254}$  *P*.

*Рухома фаза:* розчин аміаку концентрований *P*1 - метанол *P* (1:99).

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

#### ВИПРОБУВАННЯ

*Розчин S.* 0.10 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Прозорість розчину (2.2.1).* Розчин *S* має бути прозорим.

*Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).* Забарвлення розчину *S* має бути не інтенсивнішим за еталон 6 шкали найбільш підходящого кольору.

*Оптичне обертання (2.2.7).* Від +0.10° до -0.10°. Визначення проводять для розчину *S*.

► *Супровідні домішки.* Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 50 мг субстанції розчиняють у 20 мл рухомої фази та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 25.0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 2 мг ФСЗ атенололу для перевірки придатності хроматографічної системи (містить домішки В, F, G, I та J) розчиняють в 1.0 мл рухомої фази.

## Атенолол

**Розчин порівняння (b).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

**Калонка:**

— розмір: 0.125 м × 4.0 мм;

— нерухома фаза: силікагель ендкепований октадецил-силільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухама фаза:** 1.0 г натрію октансульфонату Р і 0.4 г тетрабутиламонію гідросульфату Р розчиняють в 1 л суміші тетрагідрофуран Р - метанол Р2 - розчин 3.4 г/л калію дигідрофосфату Р (20:180:800); рН доводять до 3.0 кислотою фосфорною Р.

**Швидкість рухомої фази:** 0.6 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 226 нм.

**Об'єм інжекції:** 10 мкл.

**Час хроматографування:** у 5 разів більше часу утримування атенололу.

**Ідентифікація домішок:** використовують хроматограму, що додається до ФСЗ атенололу для перевірки придатності хроматографічної системи та хроматограму розчину порівняння (а) для ідентифікації піків домішок В, F, G, I та J.

**Відносні часи утримування** до атенололу (час утримування атенололу близько 8 хв): домішки В — близько 0.3; домішки J — близько 0.7; домішки I — близько 0.8; домішки F ≅ близько 2.0 (два піки); домішки G — близько 3.5.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (а):

— коефіцієнт розділення: не менше 1.4 для піків домішок J (неідентифікована домішка) та I.

**Нормування:**

— **поправковий коефіцієнт:** для розрахунку вмісту множать площу піка домішки I на 1.5;

— **домішка В:** площа піка не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.2 %);

— **домішки F, G, I:** площа піка кожної домішки не має перевищувати 1.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.15 %);

— **неспецифіковані домішки:** площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.10 %);

— **сума домішок:** сума площ піків не має перевищувати 5 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %);

— **не враховують:** піки, площа яких становить 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %). ▲

**Хлориди (2.4.4).** Не більше 0.1 %.

50 мг субстанції розчиняють у суміші 1 мл кислоти азотної розведеної Р і 15 мл води Р. Одержаний

розчин має витримувати випробування на хлориди без подальшого додавання кислоти азотної розведеної Р.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

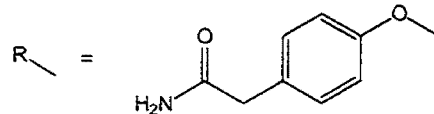
0.200 г субстанції розчиняють у 80 мл кислоти оцтової безводної Р і титрують 0.1 М розчином кислоти хлорної потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0.1 М розчину кислоти хлорної відповідає 26.63 мг  $C_{14}H_{22}N_2O_3$ .

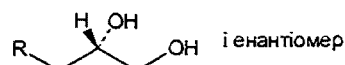
## ▼ ДОМІШКИ

**Специфіковані домішки: В, F, G, I.**

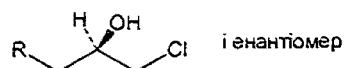
**Інші домішки, що виявляються** (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): А, D, E, H.



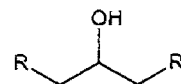
**A. R-H:** 2-(4-гідроксифеніл)ацетамід,



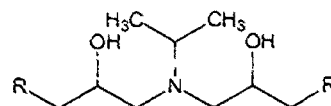
**B. 2-[4-[(2RS)-2,3-дигідроксипропокси]феніл]ацетамід,**



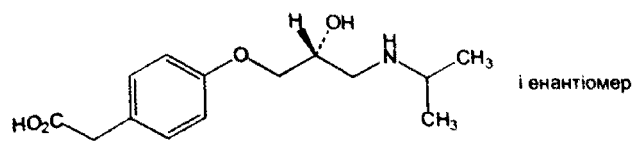
**D. 2-[4-[(2RS)-3-хлор-2-гідроксипропокси]феніл]ацетамід,**



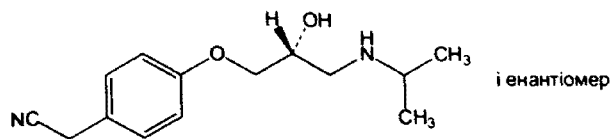
**E. 2,2'-[(2-гідроксипропан-1,3-дііл)біс(окси-4,1-фенілен)]діацетамід,**



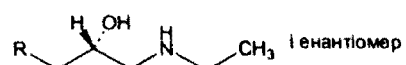
**F. 2,2'-[[1-метилетил]іміно]біс[(2-гідроксипропан-3,1-дііл)окси-4,1-фенілен]]діацетамід,**



**G.** 2-[4-[(2*RS*)-2-гідрокси-3-[(1-метилетил)аміно]пропокси]феніл]оцтова кислота,



**H.** 2-[4-[(2*RS*)-2-гідрокси-3-[(1-метилетил)аміно]пропокси]феніл]ацетонітрил,



**I.** 2-[4-[(2*RS*)-3-(етиламіно)-2-гідроксипропокси]феніл]ацетамід. ▲





# В

## ВАЗЕЛІН

### Vaselinum album

#### PARAFFIN, WHITE SOFT

Очищена та повністю або частково знебарвлена суміш напівтвердих вуглеводнів, одержаних із нафти. Може містити підхожий антиоксидант. Вазелін, описаний у даній монографії, не придатний для виробництва лікарських засобів для орального застосування.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Напівпрозора, м'яка на дотик маса білого або майже білого кольору, у розплавленому стані злегка флуоресцююча при денному світлі.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді *P*,  $\blacktriangleright$  мало розчинний у метиленхлориді *P*  $\blacktriangleleft$ , практично не розчинний у 96 % спирті *P* і гліцерині *P*.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В, Д.

Друга ідентифікація: А, С, Д.

**А.** Температура краплепадіння. Від 35 °С до 70 °С, не має відрізнятись більше ніж на 5 °С від зазначеної на етикетці, що визначена методом (2.2.17). Визначення проводять із такими змінами щодо заповнення чашечки. Субстанцію нагрівають до температури не вище 80 °С при перемішуванні для забезпечення однорідності. Металеву чашечку нагрівають до температури не вище 80 °С, поміщають на чисту пластинку або керамічну плитку та виливають достатню кількість розплавленого зразка у чашечку якомога повніше. Заповнену чашечку охолоджують протягом 30 хв на пластинці або керамічній плитці та витримують у водяній бані при температурі від 24 °С до 26 °С протягом від 30 хв до 40 хв. Розрівнюють поверхню субстанції одним рухом ножа або леза бритви, уникаючи ущільнення субстанції.

**В.** Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

$\blacktriangleright$  Підготування зразка: близько 2 мг субстанції поміщають на диск натрію хлориду *P*, розподіляють суб-

станцію на інший диск натрію хлориду *P* та один із дисків видаляють.

**Відповідність:** дану процедуру повторюють із використанням ФСЗ вазеліну.  $\blacktriangleleft$

**С.** 2 г субстанції плавлять до одержання однорідної маси, додають 2 мл води *P* і 0.2 мл 0.05 *M* розчину йоду, струшують і охолоджують; твердий верхній шар має бути фіолетово-рожевого  $\blacktriangleright$  або коричневого  $\blacktriangleleft$  кольору.

**Д.** Субстанція має відповідати вимогам щодо кольоровості, зазначеним у розділі «Випробування».

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Кольоровість (2.2.2, метод II).** Субстанція білого кольору. 12 г субстанції плавлять на водяній бані. Забарвлення розплавленої маси має бути не інтенсивнішим суміші жовтий вихідний розчин – розчин 10 г/л кислоти хлористоводневої *P* (1:9).

**Кислотність або лужність.** До 10 г субстанції додають 20 мл киплячої води *P*, енергійно струшують протягом 1 хв, охолоджують і декантують. До 10 мл водного шару додають 0.1 мл розчину фенолфталеїну *P*; розчин безбарвний. Червоне забарвлення має з'явитися при додаванні не більше 0.5 мл 0.01 *M* розчину натрію гідроксиду.

**Консистенція (2.9.9).** Від 60 до 300.

**Поліциклічні ароматичні вуглеводні.** Використовують реактиви для спектрофотометрії в УФ-області. 1.0 г субстанції розчиняють у 50 мл гексану *P*, що двічі попередньо струшують із 10 мл диметилсульфоксиду *P*. Одержаний розчин переносять у ділильну ліжку місткістю 125 мл із незмащеними притертими частинами (пробкою і краном), додають 20 мл диметилсульфоксиду *P*, енергійно струшують протягом 1 хв і відстоюють до одержання двох прозорих шарів. Нижній шар переносять у другу ділильну ліжку та повторюють екстракцію ще із 20 мл диметилсульфоксиду *P*. Об'єднані нижні шари енергійно струшують із 20 мл гексану *P* протягом 1 хв і відстоюють до утворення двох прозорих шарів. Нижній шар відділяють і доводять диметилсульфоксидом *P* до об'єму 50.0 мл. Вимірюють оптичну густину (2.2.25) одержаного розчину в області довжин хвиль від 260 нм до 420 нм за довжини оптичного шляху 4 см і використовуючи як компенсаційний розчин прозорий

нижній шар, одержаний енергійним струшуванням 10 мл диметилсульфоксиду Р і 25 мл гексану Р протягом 1 хв. Як розчин порівняння використовують розчин диметилсульфоксиду Р, що містить 6.0 мг/л нафталіну Р. Вимірюють оптичну густину одержаного розчину в максимумі за довжини хвилі 278 нм за довжини оптичного шляху 4 см і використовуючи як компенсаційний розчин диметилсульфоксид Р. Оптична густина випробовуваного розчину в області довжин хвиль від 260 нм до 420 нм не має перевищувати оптичну густину розчину порівняння за довжини хвилі 278 нм.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.05 %. Визначення проводять із 2.0 г субстанції.

## ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

## МАРКУВАННЯ

Зазначають номінальне значення температури краплепадіння.

N

Замість випробування «Консистенція» допускається застосування випробування «В'язкість» (2.2.8).

В'язкість (2.2.8). Не менше  $16 \text{ мм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . Визначення проводять методом капілярної віскозиметрії (2.2.9) при температурі  $(60 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$ .

# ВОДА ВИСОКООЧИЩЕНА

## Aqua valde purificata

### WATER, HIGHLY PURIFIED

H<sub>2</sub>O

М.м. 18.02

Вода високоочищена призначена для приготування лікарських засобів, коли потрібна вода підвищеної біологічної якості, крім тих випадків, у яких необхідне використання тільки Води для ін'єкцій.

## ВИРОБНИЦТВО

Воду високоочищену одержують із води питної. У цей час у виробництві використовують метод подвійного зворотного осмосу спільно з іншими підходящими методами, наприклад, ультрафільтрацією

і деіонізацією. Необхідне належне утримування та технічне обслуговування системи очищення води.

Для того, щоб гарантувати належну якість води, застосовують валідовані методики та моніторинг у процесі виробництва питомої електропровідності та регулярний мікробний контроль.

Для води високоочищеної при зберіганні та у мережі дистрибуції мають бути створені умови, що запобігають росту мікроорганізмів і дозволяють уникнути будь-якого іншого забруднення.

**Мікробіологічний моніторинг.** Протягом виробництва та подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують кількість мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підхожу межу, що попереджає, і підхожу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 10 КУО/100мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи фільтр із номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм, густе живильне середовище R2A агар, не менше 200 мл води високоочищеної. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом не менше 5 діб.

### R2A agar

Дріжджовий екстракт	0.5 г
Протеозопептон	0.5 г
Гідролізат казеїну	0.5 г
Глюкоза	0.5 г
Крохмаль	0.5 г
Дикалію гідрофосфат	0.3 г
Магнію сульфат безводний	0.024 г
Натрію піруват	0.3 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	до 1000 мл

Установлюють рН середовища таким чином, щоб після стерилізації його значення становило  $7.2 \pm 0.2$ . Стерилізують у паровому стерилізаторі при температурі 121 °С протягом 15 хв.

### Ростові властивості густого живильного середовища R2A агар

— Приготування тест-штамів. Використовують стандартизовані стабільні суспензії тест-штамів або готують їх як зазначено в Таблиці 1927.-1. Якщо для одержання посівного матеріалу використано техніку пересівань, то життєздатні мікроорганізми, використовувані для інокуляції, мають бути одержані не більше як 5 пасажами вихідного тест-штаму. Вирощують кожний штам окремо, як зазначено в Таблиці 1927.-1. Для приготування робочих суспензій використовують буферний розчин із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 або фосфатний буферний розчин рН 7.2. Суспензії використовують протягом 2 год або протягом 24 год при зберіганні при температурі (2-8) °С. Як альтернативу розведенню свіжої суспензії вегетативних клітин *Bacillus subtilis*, готують ста-

більшу суспензію спор, а потім використовують її підходящий об'єм для інокуляції. Стабільна суспензія спор має зберігатися при температурі (2-8) °C протягом валідованого періоду часу.

- **Ростові властивості.** Випробовують кожну серію готового середовища та кожну серію середовища, приготованого із дегідратованого середовища або із описаних інгредієнтів. Інокують чашки із R2A агаром окремо із невеликою кількістю (не більше 100 КУО) мікроорганізмів, зазначених в Таблиці 1927.-1. Інкубацію проводять в умовах, зазначених в Таблиці 1927.-1. Одержана кількість колоній не має відрізнятись більше ніж у 2 рази від кількості колоній, одержаної для стандартизованого інокуляту. Для свіжоприготованого інокуляту ріст мікроорганізмів на випробовуваному середовищі має бути співставним із ростом мікроорганізмів на попередньо контрольованій та дозволеній до використання серії середовища.

Таблиця 1927.-1.

Ростові властивості густого живильного середовища R2A агар

Мікроорганізм	Приготування тест-штаму	Ростові властивості
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> наприклад: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	соево-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульйон (30-35) °C (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °C ≤ 3 діб
<i>Bacillus subtilis</i> наприклад: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	соево-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульйон (30-35) °C (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °C ≤ 3 діб

**Загальний органічний вуглець (2.2.44).** Не більше 0.5 мг/л.

**Питома електропровідність.** Визначають питому електропровідність off-line або in-line як описано нижче.

#### ПРИЛАД

**Вимірювальна комірка:**

— електроди із підходящого матеріалу, наприклад, із нержавіючої сталі;

- стала вимірювальної комірки: сталу вимірювальної комірки звичайно встановлює постачальник, потім вона верифікується через певні відтинки часу із використанням сертифікованого розчину порівняння з питомою електропровідністю менше 1500 мкСм·см<sup>-1</sup> або шляхом порівняння із коміркою із сертифікованою сталюю вимірювальної комірки; стала вимірювальної комірки має знаходитися у межах 2 % від встановленого значення, у противному разі має бути проведене повторне калібрування.

**Кондуктометр:** правильність — не менше 0.1 мкСм·см<sup>-1</sup> для найменшого значення робочого діапазону. ▲

**Калібрування системи (вимірювальної комірки та кондуктометра):**

- із використанням одного або більше підхожих сертифікованих стандартних розчинів;
- правильність: у межах 3 % від вимірюваної питомої електропровідності плюс 0.1 мкСм·см<sup>-1</sup>.

▼ **Калібрування кондуктометра:** калібрування проводиться для кожного діапазону вимірювання, після від'єднання вимірювальної комірки, із використанням сертифікованих прецизійних резисторів або еквівалентних приладів із невизначеністю не більше 0.1 % від сертифікованого значення.

Якщо in-line-вимірювальна комірка не може бути від'єднана від системи, калібрування системи може бути проведене із використанням приладів для вимірювання електропровідності із каліброваною вимірювальною коміркою, що поміщають поряд із коміркою, яку калібрують, у струмінь води.

**Температура вимірювання:** припустиме відхилення ± 2 °C. ▲

#### МЕТОДИКА

##### Етап 1

1. Вимірюють питому електропровідність без температурної компенсації, одночасно реєструючи температуру. Вимірювання із температурною компенсацією може проводитися після відповідної валідації.
2. Використовуючи дані, наведені в Таблиці 1927.-2, знаходять найближче значення температури, що не перевищує значення виміряної температури. Відповідне значення питомої електропровідності є граничним для даної температури.
3. Якщо виміряна питома електропровідність не перевищує значення, наведене в Таблиці 1927.-2, випробовувана субстанція витримує випробування на питому електропровідність. Якщо значення питомої електропровідності перевищує наведене в Таблиці 1927.-2, продовжують випробування (етап 2).

##### Етап 2

4. Достатню кількість випробовуваної субстанції (100 мл або більше) переносять у підходящий контейнер і перемішують. Доводять температуру, якщо необхідно, до (25±1) °C і, підтримуючи цю температуру, починають ретельно струшувати випробовуваний зразок, періодично реєструючи питому електропровідність. Коли зміни у значенні питомої електропровідності, що зумовлені поглинанням вуглецю діоксиду повітря, не перевищуватимуть 0.1 мкСм·см<sup>-1</sup> протягом 5 хв, записують значення питомої електропровідності.

5. Субстанція витримує випробування на питому електропровідність, якщо значення питомої електропровідності не перевищує  $2.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ . Якщо значення питомої електропровідності більше  $2.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ , продовжують випробування (етап 3).

Таблиця 1927.-2.

Етап 1 – Граничні значення питомої електропровідності для певних значень температури (для вимірювання питомої електропровідності без температурної компенсації)

Температура (°C)	Питома електропровідність ( $\text{мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ )
0	0.6
5	0.8
10	0.9
15	1.0
20	1.1
25	1.3
30	1.4
35	1.5
40	1.7
45	1.8
50	1.9
55	2.1
60	2.2
65	2.4
70	2.5
75	2.7
80	2.7
85	2.7
90	2.7
95	2.9
100	3.1

Етап 3

6. Випробування проводять протягом близько 5 хв після визначення питомої електропровідності (крок 5, етап 2), підтримуючи температуру випробовуваного зразка ( $25 \pm 1$ ) °C. У випробовуваний зразок додають свіжоприготований насичений розчин *калію хлориду* P (0.3 мл в 100 мл випробовуваного зразка) і вимірюють рН (2.2.3) із точністю 0.1.
7. Використовуючи Таблицю 1927.-3, із значення рН, виміряного у кроці 6, визначають граничне значення питомої електропровідності. Якщо значення питомої електропровідності, визначене у кроці 4 етапу 2, не перевищує вимог до питомої електропровідності для визначеного рН, субстанція витримує випробування на питому електропровідність. Якщо значення питомої електропровідності, визначене у кроці 4 етапу 2, перевищує це значення або значення рН виходить за межі 5.0-7.0, субстанція не витримує випробування на питому електропровідність.

## ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна рідина.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції помішають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л *калію хлориду* P, 0.1 мл *розчину дифеніламіну* P і краплями, при перемішуванні, 5 мл *кислоти сірчаної, вільної від азоту*, P. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °C; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно з випробовуваним розчином із використанням суміші 4.5 мл *води, вільної від нітратів*, P і 0.5 мл *еталонного розчину нітрату* (2 ppm  $\text{NO}_3$ ) P.

**Алюміній** (2.4.17). Не більше 0.000001 % (10 ppb), якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

**Випробовуваний розчин.** До 400 мл субстанції додають 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0* P і 100 мл *води дистильованої* P.

**Розчин порівняння.** Змішують 2 мл *еталонного розчину алюмінію* (2 ppm Al) P, 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0* P і 98 мл *води дистильованої* P.

**Холостий розчин.** Змішують 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0* P і 100 мл *води дистильованої* P.

■

Таблиця 1927.-3.

Етап 3 – Граничні значення питомої електропровідності для певних значень рН (для зразків, урівноважених з оточуючими атмосферою та температурою)

рН	Питома електропровідність ( $\text{мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ )
5.0	4.7
5.1	4.1
5.2	3.6
5.3	3.3
5.4	3.0
5.5	2.8
5.6	2.6
5.7	2.5
5.8	2.4
5.9	2.4
6.0	2.4
6.1	2.4
6.2	2.5
6.3	2.4
6.4	2.3
6.5	2.2
6.6	2.1
6.7	2.6
6.8	3.1
6.9	3.8
7.0	4.6

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Менше 0.25 МО/мл.

## МАРКУВАННЯ

Якщо необхідно, зазначають:

— субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.

## ВОДА ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

## Aqua ad iniectionabilia

## WATER FOR INJECTIONS

H<sub>2</sub>O

М.м. 18.02

Вода для ін'єкцій — вода, яка використовується як розчинник при приготуванні лікарських засобів для парентерального застосування (вода для ін'єкцій «in bulk») або для розчинення, або для розведення субстанцій або лікарських засобів для парентерального застосування перед використанням (вода для ін'єкцій стерильна).

## Вода для ін'єкцій «in bulk»

## ВИРОБНИЦТВО

Воду для ін'єкцій «in bulk» одержують із води питної або із води очищеної шляхом дистиляції на обладнанні, частини якого, що контактують із водою, виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підходячого металу. Обладнання має бути забезпечене ефективним пристроєм для запобігання захоплення крапель. Необхідне належне утримування і технічне обслуговування обладнання. Першу порцію води, одержану на початку роботи, відкидають, потім дистилят збирають.

Для того, щоб гарантувати належну якість води, застосовують валідовані процедури та моніторинг у процесі виробництва питомої електропровідності та регулярний мікробний контроль.

Для води для ін'єкцій «in bulk» при зберіганні та у мережі дистрибуції мають бути створені умови, що запобігають росту мікроорганізмів і дозволяють уникнути будь-якого іншого забруднення.

**Мікробіологічний моніторинг.** Протягом виробництва та подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують кількість мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підхожу межу, що попереджає, і підхожу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 10 КУО/100 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи фільтр із номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм, густе живильне середовище R2A агар, не менше 200 мл води для ін'єкцій «in bulk» та інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом не менше 5 діб. При виробництві води для ін'єкцій «in bulk» в асептичних умовах може виникнути необхідність встановити більш жорсткі межі, що попереджають.

## R2A агар

Дріжджовий екстракт	0.5 г
Протеозопептон	0.5 г
Гідролізат казеїну	0.5 г
Глюкоза	0.5 г
Крохмаль	0.5 г
Дикалію гідрофосфат	0.3 г
Магнію сульфат безводний	0.024 г
Натрію піруват	0.3 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	до 1000 мл

Установлюють рН середовища таким чином, щоб після стерилізації його значення становило 7.2±0.2. Стерилізують у паровому стерилізаторі при температурі 121 °С протягом 15 хв.

*Ростові властивості густого живильного середовища R2A агар*

— *Приготування тест-штамів.* Використовують стандартизовані стабільні суспензії тест-штамів або готують їх як зазначено в Таблиці 0169.-1. Якщо для одержання посівного матеріалу використано техніку пересівань, то життєздатні мікроорганізми, використовувані для інокуляції, мають бути одержані не більше як 5 пасажами вихідного тест-штаму. Вирощують кожний штам окремо, як зазначено в Таблиці 0169.-1. Для приготування робочих суспензій використовують буферний розчин із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 або фосфатний буферний розчин рН 7.2. Суспензії використовують протягом 2 год або протягом 24 год при зберіганні при температурі (2-8) °С. Як альтернативу розведенню свіжої суспензії вегетативних клітин *Bacillus subtilis*, готують стабільну суспензію спор, а потім використовують її підхожий об'єм для інокуляції. Стабільна суспензія спор має зберігатися при температурі (2-8) °С протягом валідованого періоду часу.

— *Ростові властивості.* Випробовують кожну серію готового середовища та кожну серію середовища, приготованого із дегідратованого середовища або із описаних інгредієнтів. Інокують чашки із R2A агаром окремо із невеликою кількістю (не більше 100 КУО) мікроорганізмів, зазначених в Таблиці 0169.-1. Інкубацію проводять в умовах, зазначених в Таблиці 0169.-1. Одержана кількість колоній не має відрізнятись більше ніж у 2 рази від кількості колоній, одержаної для стандартизованого інокуляту. Для свіжоприготованого інокуляту ріст мікроорганізмів на випробовуваному середовищі має бути співставним із ростом мікроорганізмів на попередньо контрольованій і дозволений до використання серії середовища.

**Загальний органічний вуглець (2.2.4А).** Не більше 0.5 мг/л.

**Питома електропровідність.** Визначають питому електропровідність off-line або in-line як описано нижче.

Таблиця 0169.-1.

Ростові властивості густого живильного середовища  
R2A агар

Мікроорганізм	Приготування тест-штаму	Ростові властивості
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> наприклад: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульон (30-35) °C (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °C ≤ 3 діб
<i>Bacillus subtilis</i> наприклад: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульон (30-35) °C (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °C ≤ 3 діб

### ПРИЛАД

#### Вимірювальна комірка:

— електроди із підходячого матеріалу, наприклад, із нержавіючої сталі;

▼ — стала вимірювальної комірки: сталу вимірювальної комірки звичайно встановлює поставачальник, потім вона верифікується через певні відтинки часу із використанням сертифікованого розчину порівняння з питомою електропровідністю менше  $1500 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$  або шляхом порівняння із коміркою із сертифікованою сталю; стала вимірювальної комірки має знаходитися у межах 2 % від встановленого значення, у протилежному разі має бути проведене повторне калібрування.

Кондуктометр: правильність — не менше  $0.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$  для найменшого значення робочого діапазону. ▲

Калібрування системи (вимірювальної комірки та кондуктометра):

— із використанням одного або більше підходящих сертифікованих стандартних розчинів;

— правильність: у межах 3 % від вимірюваної питомої електропровідності плюс  $0.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ .

▼ Калібрування кондуктометра: калібрування проводиться для кожного діапазону вимірювання, після від'єднання вимірювальної комірки, із використанням сертифікованих прецизійних резисторів або еквівалентних приладів із невизначеністю не більше 0.1 % від сертифікованого значення.

Якщо in-line-вимірювальна комірка не може бути від'єднана від системи, калібрування системи може бути проведене із використанням приладів для вимірювання електропровідності із каліброваною вимірювальною коміркою, що поміщають поряд із коміркою, яку калібрують, у струмінь води.

Температура вимірювання: припустиме відхилення  $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . ▲

### МЕТОДИКА

#### Етап 1

1. Вимірюють питому електропровідність без температурної компенсації, одночасно реєструючи температуру. Вимірювання із температурною компенсацією може проводитися після відповідної валідації.
2. Використовуючи дані, наведені в Таблиці 0169.-2, знаходять найближче значення температури, що не перевищує значення виміряної температури. Відповідне значення питомої електропровідності є граничним для даної температури.
3. Якщо виміряна питома електропровідність не перевищує значення, наведене в Таблиці 0169.-2, випробовувана субстанція витримує випробування на питому електропровідність. Якщо значення питомої електропровідності перевищує наведене в Таблиці 0169.-2, продовжують випробування (етап 2).

Таблиця 0169.-2.

Етап 1 — Граничні значення питомої електропровідності для певних значень температури (для вимірювання питомої електропровідності без температурної компенсації)

Температура (°C)	Питома електропровідність (мкСм·см <sup>-1</sup> )
0	0.6
5	0.8
10	0.9
15	1.0
20	1.1
25	1.3
30	1.4
35	1.5
40	1.7
45	1.8
50	1.9
55	2.1
60	2.2
65	2.4
70	2.5
75	2.7
80	2.7
85	2.7
90	2.7
95	2.9
100	3.1

#### Етап 2

4. Достатню кількість випробовуваної субстанції (100 мл або більше) переносять у підходящий контейнер і перемішують. Доводять температуру, якщо необхідно, до  $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  і, підтримуючи цю температуру, починають ретельно струшувати випробовуваний зразок, періодично реєструючи питому електропровідність. Коли зміни у значенні питомої електропровідності, що зумовлені поглинанням вуглецю діоксиду повітря, не перевищуватимуть  $0.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$  протягом 5 хв, записують значення питомої електропровідності.
5. Субстанція витримує випробування на питому електропровідність, якщо значення питомої електропровідності не перевищує  $2.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ . Якщо значення питомої електропровідності більше  $2.1 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ , продовжують випробування (етап 3).

## Етап 3

6. Випробування проводять протягом близько 5 хв після визначення питомої електропровідності (крок 5, етап 2), підтримуючи температуру випробовуваного зразка ( $25 \pm 1$ ) °С. У випробовуваний зразок додають свіжоприготований насичений розчин *калію хлориду Р* (0.3 мл в 100 мл випробовуваного зразка) і вимірюють рН (2.2.3) із точністю 0.1.
7. Використовуючи Таблицю 0169.-3, із значення рН, виміряного у кроці 6, визначають граничне значення питомої електропровідності. Якщо значення питомої електропровідності, визначене у кроці 4 етапу 2, не перевищує вимог до питомої електропровідності для визначеного рН, субстанція витримує випробування на питому електропровідність. Якщо значення питомої електропровідності, визначене у кроці 4 етапу 2, перевищує це значення або значення рН виходить за межі 5.0-7.0, субстанція не витримує випробування на питому електропровідність.

Таблиця 0169.-3.

Етап 3 — Значення питомої електропровідності для певних значень рН (для зразків урівноважених з оточуючими атмосферою та температурою)

рН	Питома електропровідність (мкСм·см <sup>-1</sup> )
5.0	4.7
5.1	4.1
5.2	3.6
5.3	3.3
5.4	3.0
5.5	2.8
5.6	2.6
5.7	2.5
5.8	2.4
5.9	2.4
6.0	2.4
6.1	2.4
6.2	2.5
6.3	2.4
6.4	2.3
6.5	2.2
6.6	2.1
6.7	2.6
6.8	3.1
6.9	3.8
7.0	4.6

## ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна рідина.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції поміщають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л *калію хлориду Р*, 0.1 мл розчину *дифеніламіну Р* і краплями, при перемішуванні, 5 мл *кислоти сірчаної, вільної від азоту, Р*. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °С; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення сталона, приготованого

паралельно із випробовуваним розчином із використанням суміші 4.5 мл *води, вільної від нітратів, Р* і 0.5 мл *еталонного розчину нітрату (2 ppm NO<sub>3</sub>) Р*.

**Алюміній (2.4.17).** Не більше 0.000001 % (10 ppm), якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

**Випробовуваний розчин.** До 400 мл субстанції додають 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р* і 100 мл *води дистильованої Р*.

**Розчин порівняння.** Змішують 2 мл *еталонного розчину алюмінію (2 ppm Al) Р*, 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р* і 98 мл *води дистильованої Р*.

**Холостий розчин.** Змішують 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р* і 100 мл *води дистильованої Р*.

■

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.25 МО/мл.

## Вода для ін'єкцій стерильна

Вода для ін'єкцій стерильна — вода для ін'єкцій «in bulk», розфасована у підходячі контейнери, укупорена і стерилізована нагріванням в умовах, які гарантують, що одержаний продукт витримує випробування на бактеріальні ендотоксини. Вода для ін'єкцій стерильна не має містити ніяких доданих речовин.

Вода для ін'єкцій стерильна має бути прозорою та безбарвною.

Кожний контейнер має містити достатню кількість води для ін'єкцій, щоб забезпечити можливість витягання номінального об'єму.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Кислотність або лужність.** До 20 мл субстанції додають 0.05 мл *розчину фенолового червоного Р*; якщо розчин забарвлюється у жовтий колір, забарвлення розчину має перейти у червоне при додаванні не більше 0.1 мл 0.01 М *розчину натрію гідроксиду*. Якщо розчин забарвлюється у червоний колір, забарвлення розчину має перейти в жовте при додаванні не більше 0.15 мл 0.01 М *розчину кислоти хлористоводневої*.

**Питома електропровідність.** Не більше 25 мкСм·см<sup>-1</sup> для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше; не більше 5 мкСм·см<sup>-1</sup> для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

Вимірювання та калібрування проводять, як зазначено для води для ін'єкцій «in bulk», підтримуючи температуру випробовуваного зразка ( $25 \pm 1$ ) °С.

► **Речовини, що окиснюються.** Для контейнерів із номінальним об'ємом менше 50 мл; до 100 мл субстанції додають 10 мл *кислоти сірчаної розведеної Р*, дово-



дять до кипіння, додають 0.4 мл 0.02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

Для контейнерів із номінальним об'ємом, що дорівнює або більше 50 мл: до 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної Р, доводять до кипіння, додають 0.2 мл 0.02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим. ▲

**Хлориди (2.4.4).** Не більше 0.00005 % (0.5 ppm) для субстанції в контейнерах із номінальним об'ємом 100 мл або менше.

15 мл субстанції мають витримувати випробування на хлориди. Еталон готують із використанням суміші 1.5 мл еталонного розчину хлориду (5 ppm Cl) Р і 13.5 мл води Р. Опалесценцію одержаних розчинів порівнюють за вертикальною віссю пробірок.

Для субстанції в контейнерах із номінальним об'ємом більше 100 мл проводять таке випробування: до 10 мл субстанції додають 1 мл кислоти азотної розведеної Р і 0.2 мл розчину срібла нітрату Р<sub>2</sub>; протягом не менше 15 хв не має бути видимих змін розчину.

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції поміщають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л калію хлориду Р, 0.1 мл розчину дифеніламіну Р і краплями, при перемішуванні, 5 мл кислоти сірчаної, вільної від азоту, Р. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °С; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно з випробовуваним розчином із використанням суміші 4.5 мл води, вільної від нітратів, Р і 0.5 мл еталонного розчину нітрату (2 ppm NO<sub>3</sub>) Р.

**Сульфати.** До 10 мл субстанції додають 0.1 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р і 0.1 мл розчину барію хлориду Р<sub>1</sub>; протягом не менше 1 год не має бути видимих змін розчину.

**Алюміній (2.4.17).** Не більше 0.000001 % (10 ppb), якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

**Випробовуваний розчин.** До 400 мл субстанції додають 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р і 100 мл води дистильованої Р.

**Розчин порівняння.** Змішують 2 мл еталонного розчину алюмінію (2 ppm Al) Р, 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р і 98 мл води дистильованої Р.

**Холостий розчин.** Змішують 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р і 100 мл води дистильованої Р.

▼ **Амонію солі.** Для контейнерів із номінальним об'ємом менше 50 мл: не більше 0.00006 % (0.6 ppm); для контейнерів із номінальним об'ємом, що до-

рівнює або більше 50 мл: не більше 0.00002 % (0.2 ppm).

Контейнери із номінальним об'ємом менше 50 мл: до 20 мл субстанції додають 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р; через 5 хв переглядають розчин за вертикальною віссю пробірки; забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого одночасно з випробовуваним розчином додаванням 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р до суміші 4 мл еталонного розчину амонію (3 ppm NH<sub>3</sub>) Р і 16 мл води, вільної від аміаку, Р.

Контейнери із номінальним об'ємом, що дорівнює або більше 50 мл: до 20 мл субстанції додають 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р; через 5 хв переглядають розчин за вертикальною віссю пробірки; забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого одночасно з випробовуваним розчином додаванням 1 мл розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р до суміші 4 мл еталонного розчину амонію (1 ppm NH<sub>3</sub>) Р і 16 мл води, вільної від аміаку, Р. ▲

**Кальцій і магній.** До 100 мл субстанції додають 2 мл аміачного буферного розчину рН 10.0 Р, 50 мг протравного чорного ІІ індикаторної суміші Р і 0.5 мл 0.01 М розчину натрію едтату; з'являється чисте синє забарвлення.

■

**Сухий залишок.** 100 мл субстанції упарюють насухо на водяній бані та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С. Маса сухого залишку має бути: не більше 4 мг (0.004 %) для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше, не більше 3 мг (0.003 %) для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

**Механічні включення: невидимі частки (2.9.19).** Субстанція має витримувати випробування А або В на механічні включення: невидимі частки.

**Стерильність (2.6.1).** Субстанція має витримувати випробування на стерильність.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.25 МО/мл.

## ВОДА ОЧИЩЕНА

## Aqua purificata

## WATER, PURIFIED

H<sub>2</sub>O

М.м. 18.02

Вода очищена — це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компетентного уповноваженого органу.

## Вода очищена «in bulk»

## ВИРОБНИЦТВО

Воду очищену «in bulk» одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном, зворотним осмосом або будь-яким іншим підходящим способом із води питної.

Для води очищеної «in bulk» при зберіганні та у мережі дистрибуції мають бути створені умови, що запобігають росту мікроорганізмів і дозволяють уникнути будь-якого іншого забруднення.

**Мікробіологічний моніторинг.** Протягом виробництва та подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують кількість мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підхожу межу, що попереджає, і підхожу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 КУО/мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи фільтр із номінальним розміром пор не більше 0,45 мкм, густе живильне середовище R2A агар. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом не менше 5 діб. Розмір зразка має вибиратися відповідно до очікуваного результату.

## R2A агар

Дріжджовий екстракт	0.5 г
Протеозопептон	0.5 г
Гідролізат казеїну	0.5 г
Глюкоза	0.5 г
Крохмаль	0.5 г
Дикалію гідрофосфат	0.3 г
Магнію сульфат безводний	0.024 г
Натрію піруват	0.3 г
Агар	15.0 г
Вода очищена	до 1000 мл

Установлюють рН середовища таким чином, щоб після стерилізації його значення становило 7.2±0.2. Стерилізують у паровому стерилізаторі при температурі 121 °С протягом 15 хв.

## Ростові властивості густого живильного середовища R2A агар

— **Приготування тест-штамів.** Використовують стандартизовані стабільні суспензії тест-штамів або готують їх як зазначено в Таблиці 0008.-1. Якщо для одержання посівного матеріалу використано техніку пересівань, то життєздатні мікроорганізми, використовувані для інокуляції, мають бути одержані не більше як 5 пасажами вихідного тест-штаму. Вирощують кожний штам окремо, як зазначено в Таблиці 0008.-1. Для приготування робочих суспензій використовують буферний розчин із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0 або фосфатний буферний розчин рН 7.2. Суспензії використовують протягом 2 год або протягом 24 год при зберіганні при температурі (2-8) °С. Як альтернативу розведенню свіжої суспензії вегетативних клітин *Bacillus subtilis*, готують стабільну суспензію спор, а потім використовують її підходящий об'єм для інокуляції. Стабільна суспензія спор має зберігатися при температурі (2-8) °С протягом валідованого періоду часу.

— **Ростові властивості.** Випробовують кожну серію готового середовища та кожну серію середовища, приготованого із дегідратованого середовища або із описаних інгредієнтів. Інокують чашки із R2A агаром окремо із невеликою кількістю (не більше 100 КУО) мікроорганізмів, зазначених в Таблиці 0008.-1. Інкубацію проводять в умовах, зазначених в Таблиці 0008.-1. Одержана кількість колоній не має відрізнятися більше ніж у 2 рази від кількості колоній, одержаної для стандартизованого інокуляту. Для свіжоприготованого інокуляту ріст мікроорганізмів на випробовуваному середовищі має бути співставним із ростом мікроорганізмів на попередньо контрольованій та дозволеній до використання серії середовища.

Таблиця 0008.-2.

## Ростові властивості густого живильного середовища R2A агар

Мікроорганізм	Приготування тест-штаму	Ростові властивості
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> наприклад: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульон (30-35) °С (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °С ≤ 3 діб
<i>Bacillus subtilis</i> наприклад: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	соєво-казеїновий агар або соєво-казеїновий бульон (30-35) °С (18-24) год	R2A агар ≤ 100 КУО (30-35) °С ≤ 3 діб

**Вміст загального органічного вуглецю або речовини, що окиснюються.** Визначають вміст загального органічного вуглецю (2.2.44): не більше 0.5 мг/л; або проводять випробування «Речовини, що окиснюються»

таким чином: до 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної Р, 0.1 мл 0.02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

**Питома електропровідність.** Визначають питому електропровідність off-line або in-line як описано нижче.

#### ПРИЛАД

**Вимірювальна комірка:**

- електроди із підходячого матеріалу, наприклад, із нержавіючої сталі;
- ▼ — стала вимірювальної комірки: сталу вимірювальної комірки звичайно встановлює поставальник, потім вона верифікується через певні відтинки часу із використанням сертифікованого розчину порівняння з питомою електропровідністю менше 1500 мкСм·см<sup>-1</sup> або шляхом порівняння із коміркою із сертифікованою сталюю вимірювальної комірки; стала вимірювальної комірки має знаходитися у межах 2 % від встановленого значення, у противному разі має бути проведене повторне калібрування.

**Кондуктометр:** правильність — не менше 0.1 мкСм·см<sup>-1</sup> для найменшого значення робочого діапазону. ▲

**Калібрування системи (вимірювальної комірки та кондуктометра):**

- із використанням одного або більше підхожих сертифікованих стандартних розчинів;
- правильність: у межах 3 % від вимірюваної питомої електропровідності плюс 0.1 мкСм·см<sup>-1</sup>.

▼ **Калібрування кондуктометра:** калібрування проводиться для кожного діапазону вимірювання, після від'єднання вимірювальної комірки, із використанням сертифікованих прецизійних резисторів або еквівалентних приладів із невизначеністю не більше 0.1 % від сертифікованого значення.

Якщо in-line-вимірювальна комірка не може бути від'єднана від системи, калібрування системи може бути проведене із використанням каліброваних приладів для вимірювання електропровідності із вимірювальною коміркою, яку поміщають поряд із коміркою, що калібрують, у струмінь води.

**Температура вимірювання:** припустиме відхилення ± 2 °С. ▲

#### МЕТОДИКА

Вимірюють питому електропровідність без температурної компенсації, одночасно реєструючи температуру. Вимірювання із температурною компенсацією може проводитися після відповідної валідації.

Субстанція витримує випробування на питому електропровідність, якщо виміряна питома елек-

тропровідність не перевищує значення, наведене в Таблиці 0008.-2.

Таблиця 0008.-2.

Граничні значення питомої електропровідності для певних значень температури

Температура (°С)	Питома електропровідність (мкСм·см <sup>-1</sup> )
0	2.4
10	3.6
20	4.3
25	5.1
30	5.4
40	6.5
50	7.1
60	8.1
70	9.1
75	9.7
80	9.7
90	9.7
100	10.2

Для значень температури, що не зазначені в Таблиці 0008.-2, розраховують граничне значення питомої електропровідності шляхом інтерполяції між найближчими попереднім і наступним значеннями, наведеними в таблиці.

▼ **Важкі метали.** Якщо вода очищена «in bulk» витримує вимоги із питомої електропровідності для води для ін'єкцій «in bulk», випробування на важкі метали, як описано нижче, не проводять. ▲

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Нітрати.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). 5 мл субстанції поміщають у пробірку, занурену в льодяну баню, додають 0.4 мл розчину 100 г/л калію хлориду Р, 0.1 мл розчину дифеніламіну Р і краплями, при перемішуванні, 5 мл кислоти сірчаної, вільної від азоту, Р. Потім пробірку переносять у водяну баню, нагріту до температури 50 °С; через 15 хв блакитне забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого паралельно з випробовуваним розчином із використанням суміші 4.5 мл води, вільної від нітратів, Р і 0.5 мл еталонного розчину нітрату (2 ppm NO<sub>3</sub>) Р.

**Алюміній (2.4.17).** Не більше 0.000001 % (10 ppb), якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу.

**Випробовуваний розчин.** До 400 мл субстанції додають 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р і 100 мл води дистильованої Р.

**Розчин порівняння.** Змішують 2 мл еталонного розчину алюмінію (2 ppm Al) Р, 10 мл ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р і 98 мл води дистильованої Р.

**Холостий розчин.** Змішують 10 мл *ацетатного буферного розчину рН 6.0 Р* і 100 мл *води дистильованої Р*.

**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.00001 % (0.1 ppm).

До 200 мл субстанції додають 0.15 мл 0.1 М розчину *кислоти азотної* та випарюють у скляній випарювальній чашці на водяній бані до об'єму 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 10 мл *еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) Р*, до якого додають 0.075 мл 0.1 М розчину *кислоти азотної*. Холостий розчин готують, використовуючи 0.075 мл 0.1 М розчину *кислоти азотної*. ▲

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.25 МО/мл, якщо субстанція призначена для виробництва розчинів для діалізу без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## МАРКУВАННЯ

Де застосовно, зазначають:

— субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.

## Вода очищена в контейнерах

Вода очищена в контейнерах — це вода очищена «in bulk», розфасована у підходячі контейнери, яка зберігається в умовах, що забезпечують мікробіологічну чистоту, що вимагається, і яка не містить ніяких доданих речовин.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора, безбарвна рідина.

## ВИПРОБУВАННЯ

Вода очищена в контейнерах має витримувати вимоги розділу «Випробування» для води очищеної «in bulk», а також випробування, наведені нижче.

**Кислотність або лужність.** До 10 мл субстанції, свіжо-прокип'яченої та охолодженої у пробірці з боросилікатного скла, додають 0.05 мл *розчину метилового червоного Р*; одержаний розчин не має забарвлюватися у червоний колір.

До 10 мл субстанції додають 0.1 мл *розчину бромтимолового синього Р1*; розчин не має забарвлюватися у синій колір.

**Речовини, що окиснюються.** До 100 мл субстанції додають 10 мл *кислоти сірчаної розведеної Р*, 0.1 мл 0.02 М *розчину калію перманганату* і кип'ятять протягом 5 хв; розчин має залишатися слабо-рожевим.

**Хлориди.** До 10 мл субстанції додають 1 мл *кислоти азотної розведеної Р* і 0.2 мл *розчину срібла нітрату Р2*; протягом не менше 15 хв не має бути видимих змін розчину.

**Сульфати.** До 10 мл субстанції додають 0.1 мл *кислоти хлористоводневої розведеної Р* і 0.1 мл *розчину барію хлориду Р1*; протягом не менше 1 год не має бути видимих змін розчину.

**Амонію солі.** Не більше 0.00002 % (0.2 ppm). До 20 мл субстанції додають 1 мл *розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р*; через 5 хв переглядають розчин за вертикальною віссю пробірки; забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона, приготованого одночасно з випробовуваним розчином додаванням 1 мл *розчину калію тетраїодомеркурату лужного Р* до суміші 4 мл *еталонного розчину амонію (1 ppm NH<sub>3</sub>) Р* і 16 мл *води, вільної від аміаку, Р*.

**Кальцій і магній.** До 100 мл субстанції додають 2 мл *аміачного буферного розчину рН 10.0 Р*, 50 мг *протравного чорного ІІ індикаторної суміші Р* і 0.5 мл 0.01 М *розчину натрію едетату*; з'являється чисте синє забарвлення.

**Сухий залишок.** Не більше 0.001 %. 100 мл субстанції упарюють насухо на водяній бані та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С. Маса сухого залишку не має перевищувати 1 мг.

► **Мікробіологічна чистота.** Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12): не більше 10<sup>2</sup> КУО в 1 мл. Визначення проводять, використовуючи соєво-казеїновий агар. ▲

## МАРКУВАННЯ

Якщо необхідно, зазначають:

— субстанція придатна для виробництва розчинів для діалізу.



## Г

## ГЕПАРИН КАЛЬЦІУ

## Heparinum calcicum

## HEPARIN CALCIUM

Субстанція містить кальцієву сіль сульфатованих глікозаміногліканів, наявну у тканинах ссавців. Субстанцію одержують із легенів великої рогатої худоби або зі слизової оболонки кишечника свиней, великої рогатої худоби або овець. При повному гідролізі субстанція вивільнює D-глюкозамін, кислоту D-глюкуронову, кислоту L-ідуонову, кислоту оцтову та кислоту сірчану. Субстанція має здатність затримувати згортання крові.

*Активність:* не менше 180 МО/мг, у перерахунку на суху речовину.

## ВИРОБНИЦТВО

Тварини, від яких одержують гепарин кальцію, мають витримувати вимоги щодо здоров'я тварин, яких використовують для споживання людиною. Усі стадії виробництва та вихідна сировина регулюються відповідною системою управління якістю. Ідентичність вихідних видів і відсутність сировини інших видів встановлюється відповідними випробуваннями у процесі виробництва.

Спосіб виробництва має звести до мінімуму або виключити вміст речовин, що знижують кров'яний тиск.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Порошок білого або майже білого кольору. Гігроскопічний.

*Розчинність.* Легко розчинний у воді Р.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Субстанція має затримувати згортання рекальцифікованої із використанням цитрату плазми овець, як зазначено в розділі «Кількісне визначення».

**B.** Спектрометрія ядерного магнітного резонансу (2.2.33).

*Випробовуваний зразок.* 20 мг субстанції розчиняють у 0.7 мл розчину 20 мкг/мл дейтерованого натрію триметилсилілпропіонату Р у дейтерію оксиді Р.

*Зразок порівняння.* 20 мг ФСЗ гепарину кальцію для ідентифікації методом ЯМР розчиняють у 0.7 мл розчину 20 мкг/мл дейтерованого натрію триметилсилілпропіонату Р у дейтерію оксиді Р.

*Прилад:* спектрометр, що працює за частоти не менше 300 МГц для протонів.

*Реєстрація <sup>1</sup>H-ЯМР спектра:*

- *кількість сканів:* не менше 16; регулюють, доки відношення сигнал/шум для сигналу гепарину метилу при 2.04 ppm становитиме не менше 1000:1;
- *температура:* близько 25 °С; спектри випробовуваного зразка та зразка порівняння мають бути отримані при однаковій температурі;
- *час реєстрації:* не менше 2 с;
- *час повтору (час реєстрації плюс час релаксації):* не менше 4 с;
- *спектральна ширина:* (10–12) ppm, центр при близько 4.5 ppm;
- *амплітуда імпульсу:* від 30° до 90°.

*Обробка даних:*

- *параметр лінійної ширини сигналу:* 0.3 Гц;
- *Фур'є-перетворення;*
- *стандартний сигнал триметилсилілпропіонату при 0.00 ppm.*

*Результати:*

- *великі сигнали гепарину кальцію мають бути наявними при: 2.05 ppm, 3.29 ppm (дублет), 4.37 ppm, 5.35 ppm і 5.43 ppm, усі із точністю ± 0.03 ppm;*
- *<sup>1</sup>H-ЯМР спектр, одержаний для випробовуваного зразка та для ФСЗ гепарину кальцію для ідентифікації методом ЯМР, мають бути якісно співставними після нормалізації 2 спектрів для одержання їх однакової інтенсивності; може спостерігатися дерматану сульфат із метиловим сигналом при (2.08±0.02) ppm; не мають ідентифікуватися сигнали більше 4 % висоти сигналу гепарину при 5.43 ppm у діапазоні (0.10–2.00) ppm, (2.10–3.10) ppm і (5.70–8.00) ppm; можуть бути наявними сигнали розчинника або технологічних домішок, вони мають бути ідентифікованими, щоб братися до уваги.*

**C.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні на супровідні домішки, із такими змінами.

## Гепарин кальцію

**Інжекція:** випробовуваний розчин (а) та розчин порівняння (с).

**Відносні часи утримування** до гепарину (час утримування гепарину близько 26 хв): дерматану сульфату та хондроїтину сульфату — близько 0.9; надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату — близько 1.3.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (с):

— відношення  $H_p$  до  $H_r$  має становити не менше 1.3, де  $H_p$  — висота піка дерматану сульфату + хондроїтину сульфату над базовою лінією;  $H_r$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком дерматану сульфату + хондроїтину сульфату та піком гепарину.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину (а) основний пік повинен мати такий самий час утримування та форму, що і основний пік на хроматограмі розчину порівняння (с).

**D.** Субстанція дає реакції на кальцій (2.3. I).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину** (2.2. I). Кількість субстанції, еквівалентну 50000 МО, розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

**Кольоровість розчину** (2.2.2, метод II). Забарвлення розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину», має бути не інтенсивнішим за еталон 5 шкали найбільш підходячого кольору.

**pH** (2.2.3). Від 5.5 до 8.0.

0.1 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Нуклеотидні домішки.** 40 мг субстанції розчиняють у 10 мл води Р. Оптична густина (2.2.25) одержаного розчину, виміряна за довжини хвилі 260 нм, має бути не більше 0.15.

**Білок.** Не більше 0.5 %, у перерахунку на суху речовину.

**Розчин А.** Змішують 2 об'єми розчину 10 г/л натрію гідроксиду Р і 2 об'єми розчину 50 г/л натрію карбонату Р і доводять водою Р до 5 об'ємів.

**Розчин В.** Змішують 2 об'єми розчину 12.5 г/л міді (II) сульфату Р і 2 об'єми розчину 29.8 г/л натрію тартрату Р і доводять водою Р до 5 об'ємів.

**Розчин С.** Суміш розчин В - розчин А (1:50).

**Розчин D.** Одержують із від 2-кратного до 4-кратного розведень фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву у воді Р. Із підходяжих розведень одержують

розчини із рН (10.25±0.25) після додавання розчинів С і D до випробовуваного розчину та розчинів порівняння.

**Випробовуваний розчин.** Субстанцію розводять водою Р до концентрації 5 мг/мл.

**Розчини порівняння.** Альбумін бичачий Р розводять водою Р до концентрації 100 мг/мл. Готують розведення одержаного розчину у воді Р, як зазначено у статті 2.5.33, метод 2.

**Холостий розчин.** Вода Р.

**Методика.** До 1 мл кожного розчину порівняння, випробовуваного розчину та холостого розчину додають 5 мл розчину С, витримують протягом 10 хв, додають 0.5 мл розчину D, перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Вимірюють оптичну густина (2.2.25) одержаних розчинів за довжини хвилі 750 нм, використовуючи розчин, приготований із холостого розчину як компенсаційну рідину.

**Розрахунки.** Як описано у статті 2.5.33, метод 2.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Розчини порівняння стабільні при кімнатній температурі протягом 24 год.**

**Випробовуваний розчин (а).** Близько 50 мг (точна наважка) субстанції розчиняють у 5.0 мл води для хроматографії Р і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

**Випробовуваний розчин (б).** Близько 0.1 г (точна наважка) субстанції розчиняють в 1.0 мл води для хроматографії Р і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення. 500 мкл одержаного розчину змішують із 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 мг/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

**Розчин порівняння (а).** 250 мг ФСЗ гепарину для фізико-хімічних методів аналізу розчиняють у воді для хроматографії Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 2.0 мл і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

**Розчин порівняння (б).** До 300 мкл ФСЗ дерматану сульфату та надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату додають 1200 мкл розчину порівняння (а) і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

**Розчин порівняння (с).** До 900 мкл води для хроматографії Р додають 100 мкл розчину порівняння (б) і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

**Розчин порівняння (d).** До 100 мкл води для хроматографії Р додають 400 мкл розчину порівняння (а), перемішують на вихровій мішалці до повного роз-

чинення, додають 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 мг/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

**Розчин порівняння (e).** До 500 мкл розчину порівняння (b) додають 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 г/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

**Передколонка:**

- розмір: 0.05 м × 2 мм;
- нерухома фаза: аніонообмінна смола Р (13 мкм).

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 2 мм;
- нерухома фаза: аніонообмінна смола Р (9 мкм);
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: 0.40 г натрію дигідрофосфату Р розчиняють в 1 л води для хроматографії Р і доводять рН до 3.0 кислотою фосфорною розведеною Р;
- рухома фаза В: 0.40 г натрію дигідрофосфату Р розчиняють в 1 л води для хроматографії Р, додають 140 г натрію перхлорату Р, доводять рН до 3.0 кислотою фосфорною розведеною Р, фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 10	75	25
10 - 35	75 → 0	25 → 100
35 - 40	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 0.22 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 202 нм.

**Урівноваження колонки:** не менше 15 хв.

**Об'єм інжекції:** по 20 мкл випробовуваного розчину (b), розчину порівняння (d) і розчину порівняння (e).

**Відносні часи утримування до гепарину (час утримування гепарину близько 26 хв):** дерматану сульфату та хондроїтину сульфату — близько 0.9; надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату — близько 1.3.

**Придатність хроматографічної системи:**

- на хроматограмі розчину порівняння (d) не мають виявлятися піки із часом утримування гепарину;
- коефіцієнт розділення: не менше 3.0 для піків дерматану сульфату + хондроїтину сульфату та надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату на хроматограмі розчину порівняння (e).

**Нормування:**

- сума дерматану сульфату та хондроїтину сульфату: площа піка не має перевищувати площу піка на хроматограмі розчину порівняння (e) (2.0 %);
- будь-яка інша домішка: не мають детектуватися піки, відмінні від піка дерматану сульфату + хондроїтину сульфату.

**Азот (2.5.9).** Від 1.5 % до 2.5 %, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять із 0.100 г субстанції.

**Кальцій.** Від 9.5 % до 11.5 %, у перерахунку на суху речовину.

Визначення проводять із 0.200 г субстанції методом комплексометричного титрування (2.5.11).

**Важкі метали (2.4.8, метод F).** Не більше 0.003 % (30 ppm).

1.0 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 3.0 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 8.0 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 60 °С над фосфору(V) оксидом Р і тиску не більше 670 Па протягом 3 год.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.01 МО/МО гепарину, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів. Для повної відповідності валідаційним критеріям може бути необхідним додавання двовалентних катіонів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять як зазначено у статті (2.7.5).

Встановлена активність має бути не менше 90 % і не більше 111 % заявленої активності. Довірчий інтервал ( $P=0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 80 % і не більше 125 % заявленої активності.

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному, повітронепроникному контейнері із контролем першого розкриття.

## МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- кількість МО/мг;
- із яких видів тварин одержано субстанцію;



— де застосовно: субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

## ГЕПАРИН НАТРІЮ

### Heparinum natricum

#### HEPARIN SODIUM

Субстанція містить натрієву сіль сульфатованих глікозаміногліканів, наявну у тканинах ссавців. Субстанцію одержують із легенів великої рогатої худоби або зі слизової оболонки кишечника свиней, великої рогатої худоби або овець. При повному гідролізі субстанція вивільнює D-глюкозамін, кислоту D-глюкуронову, кислоту L-ідуонову, кислоту оцтову та кислоту сірчану. Субстанція має здатність затримувати згортання крові.

▼ **Активність:** не менше 180 МО/мг, у перерахунку на суху речовину. ▲

#### ВИРОБНИЦТВО

▼ Тварини, від яких одержують гепарин натрію, мають витримувати вимоги щодо здоров'я тварин, яких використовують для споживання людиною. Усі стадії виробництва та вихідна сировина регулюються відповідною системою управління якістю. Ідентичність вихідних видів і відсутність сировини інших видів встановлюється відповідними випробуваннями у процесі виробництва. ▲

Спосіб виробництва має звести до мінімуму або виключити вміст речовин, що знижують кров'яний тиск.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору. Гігроскопічний.

**Розчинність.** Легко розчинний у воді Р.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Субстанція має затримувати згортання рекальцифікованої із використанням цитрату плазми овець, як зазначено в розділі «Кількісне визначення».

▼ **В.** Спектрометрія ядерного магнітного резонансу (2.2.33).

**Розчин А.** Розчин у дейтерію оксиді Р, що містить 20 мкг/мл дейтерованого натрію триметилсилілпропіонату Р, та, якщо інтенсивність сигналу при 5.22 ppm менше 80 % сигналу при 5.44 ppm, 12 мкг/мл натрію едетату Р.

**Випробовуваний зразок.** 20 мг субстанції розчиняють у 0.7 мл розчину А.

**Зразок порівняння.** 20 мг ФСЗ гепарину натрію для ідентифікації методом ЯМР розчиняють у 0.7 мл розчину А.

**Розчини натрію едетату та дейтерованого натрію триметилсилілпропіонату** мають зберігатися у флаконах із поліетилену високої щільності без добавок.

**Прилад:** спектрометр, що працює за частоти не менше 300 МГц для протонів.

**Реєстрація <sup>1</sup>H-ЯМР спектра:**

- **кількість сканів:** не менше 16; регулюють, доки відношення сигнал/шум для сигналу гепарину метилу при 2.04 ppm становитиме не менше 1000:1;
- **температура:** близько 25 °С; спектри випробовуваного зразка та зразка порівняння мають бути отримані при однаковій температурі;
- **час реєстрації:** не менше 2 с;
- **час повтору** (час реєстрації плюс час релаксації): не менше 4 с;
- **спектральна ширина:** (10-12) ppm, центр при близько 4.5 ppm;
- **амплітуда імпульсу:** від 30° до 90°.

**Обробка даних:**

- **параметр лінійної ширини сигналу:** 0.3 Гц;
- Фур'є-перетворення;
- стандартний сигнал триметилсилілпропіонату при 0.00 ppm.

**Результати:**

- великі сигнали гепарину натрію мають бути наявними при: 2.04 ppm, 3.27 ppm (дублет), 4.34 ppm, 5.22 ppm і 5.42 ppm, усі із точністю ± 0.03 ppm;
- <sup>1</sup>H-ЯМР спектр, одержаний для випробовуваного зразка та для ФСЗ гепарину натрію для ідентифікації методом ЯМР, мають бути якісно співставними після нормалізації 2 спектрів для одержання їх однакової інтенсивності; може спостерігатися дерматану сульфат із метиловим сигналом при (2.08±0.02) ppm; не мають ідентифікуватися сигнали більше 4 % висоти сигналу гепарину при 5.42 ppm у діапазоні (0.10-2.00) ppm, (2.10-3.10) ppm і (5.70-8.00) ppm; можуть бути наявними сигнали розчинника або технологічних домішок, вони мають бути ідентифікованими, щоб братися до уваги; інтенсивність деяких сигналів на ділянках спектра гепарину може бути різною: ділянки із різною інтенсивністю сигналів спостерігаються у діапазоні від 3.35 ppm до 4.55 ppm, але кількість ліній та їх зсуви не змінюються.

**С.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні на супровідні домішки, із такими змінами.

*Інжекція:* випробовуваний розчин (а) та розчин порівняння (с).

*Відносні часи утримування* до гепарину (час утримування гепарину близько 26 хв): дерматану сульфату та хондроїтину сульфату — близько 0.9; надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату — близько 1.3.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (с):

— відношення  $H_p$  до  $H_s$  має становити не менше 1.3, де  $H_p$  — висота піка дерматану сульфату + хондроїтину сульфату над базовою лінією;  $H_s$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком дерматану сульфату + хондроїтину сульфату та піком гепарину.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину (а) основний пік повинен мати такий самий час утримування та форму, що і основний пік на хроматограмі розчину порівняння (с).

**D.** Субстанція має відповідати вимогам щодо вмісту натрію, зазначеним у розділі «Випробування». ▲

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** Кількість субстанції, еквівалентну 50000 МО, розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Забарвлення розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину», має бути не інтенсивнішим за еталон 5 шкали найбільш підходящого кольору.

**pH (2.2.3).** Від 5.5 до 8.0.

0.1 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Нуклеотидні домішки.** 40 мг субстанції розчиняють у 10 мл води Р. Оптична густина (2.2.25) одержаного розчину, виміряна за довжини хвилі 260 нм, має бути не більше 0.15.

▼ **Блок.** Не більше 0.5 %, у перерахунку на суху речовину.

*Розчин А.* Змішують 2 об'єми розчину 10 г/л натрію гідроксиду Р і 2 об'єми розчину 50 г/л натрію карбонату Р і доводять водою Р до 5 об'ємів.

*Розчин В.* Змішують 2 об'єми розчину 12.5 г/л міді (II) сульфату Р і 2 об'єми розчину 29.8 г/л натрію тартрату Р і доводять водою Р до 5 об'ємів.

*Розчин С.* Суміш розчин В - розчин А (1:50).

*Розчин D.* Одержують із від 2-кратного до 4-кратного розведень фосфорномолібденово-вольфрамового

реактиву у воді Р. Із підходящих розведень одержують розчини із рН ( $10.25 \pm 0.25$ ) після додавання розчинів С і D до випробовуваного розчину та розчинів порівняння.

*Випробовуваний розчин.* Субстанцію розводять водою Р до концентрації 5 мг/мл.

*Розчини порівняння.* Альбумін бичачий Р розводять водою Р до концентрації 100 мг/мл. Готують розведення одержаного розчину у воді Р, як зазначено у статті 2.5.33, метод 2.

*Холостий розчин.* Вода Р.

*Методика.* До 1 мл кожного розчину порівняння, випробовуваного розчину та холостого розчину додають 5 мл розчину С, витримують протягом 10 хв, додають 0.5 мл розчину D, перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Вимірюють оптичну густина (2.2.25) одержаних розчинів за довжини хвилі 750 нм, використовуючи розчин, приготований із холостого розчину як компенсаційну рідину.

*Розрахунки.* Як описано у статті 2.5.33, метод 2.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Розчини порівняння стабільні при кімнатній температурі протягом 24 год.*

*Випробовуваний розчин (а).* Близько 50 г (точна навážка) субстанції розчиняють у 5.0 мл води для хроматографії Р і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

*Випробовуваний розчин (b).* Близько 0.1 мг (точна навážка) субстанції розчиняють у 1.0 мл води для хроматографії Р і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення. 500 мкл одержаного розчину змішують із 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 мг/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

*Розчин порівняння (а).* 250 мг ФСЗ гепарину для фізико-хімічних методів аналізу розчиняють у воді для хроматографії Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 2.0 мл і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

*Розчин порівняння (b).* До 300 мкл ФСЗ дерматану сульфату та надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату додають 1200 мкл розчину порівняння (а) і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

*Розчин порівняння (с).* До 900 мкл води для хроматографії Р додають 100 мкл розчину порівняння (b) і перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення.

*Розчин порівняння (d).* До 100 мкл води для хроматографії Р додають 400 мкл розчину порівняння (а),

## Гепарин натрію

перемішують на вихровій мішалці до повного розчинення, додають 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 мг/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

**Розчин порівняння (e).** До 500 мкл розчину порівняння (b) додають 250 мкл 1 М розчину кислоти хлористоводневої Р, потім додають 50 мкл розчину 250 мг/мл натрію нітриту Р, обережно перемішують і витримують при кімнатній температурі протягом 40 хв перед додаванням 200 мкл 1 М розчину натрію гідроксиду для припинення реакції.

**Передколонка:**

- розмір: 0.05 м × 2 мм;
- нерухома фаза: аніонообмінна смола Р (13 мкм).

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 2 мм;
- нерухома фаза: аніонообмінна смола Р (9 мкм);
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: 0.40 г натрію дигідрофосфату Р розчиняють в 1 л води для хроматографії Р і доводять рН до 3.0 кислотою фосфорною розведеною Р;
- рухома фаза В: 0.40 г натрію дигідрофосфату Р розчиняють в 1 л води для хроматографії Р, додають 140 г натрію перхлорату Р, доводять рН до 3.0 кислотою фосфорною розведеною Р, фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 10	75	25
10 - 35	75 → 0	25 → 100
35 - 40	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 0.22 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 202 нм.

**Урівноваження колонки:** не менше 15 хв.

**Об'єм інжекції:** по 20 мкл випробовуваного розчину (b), розчину порівняння (d) і розчину порівняння (e).

**Відносні часи утримування** до гепарину (час утримування гепарину близько 26 хв): дерматану сульфату + хондроїтину сульфату — близько 0.9; надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату — близько 1.3.

**Придатність хроматографічної системи:**

- на хроматограмі розчину порівняння (d) не мають виявлятися піки із часом утримування гепарину;
- коефіцієнт розділення: не менше 3.0 для піків дерматану сульфату + хондроїтину сульфату та надлишково сульфатованого хондроїтину сульфату на хроматограмі розчину порівняння (e).

**Нормування:**

- сума дерматану сульфату та хондроїтину сульфату: площа піка не має перевищувати площу піка на хроматограмі розчину порівняння (e) (2.0 %);
- будь-яка інша домішка: не мають детектуватися піки, відмінні від піка дерматану сульфату + хондроїтину сульфату. ▲

**Азот (2.5.9).** ▼ Від 1.5 % до 2.5 % ▲, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять із 0.100 г субстанції.

**Натрій.** Від 9.5 % до 12.5 %, у перерахунку на суху речовину.

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23, метод I).

**Випробовуваний розчин.** 50 мг субстанції розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, що містить 1.27 мг цезію хлориду Р в 1 мл, і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчини порівняння.** Розчини порівняння зі вмістом 25 ppm, 50 ppm і 75 ppm Na, готують відповідними розведеннями еталонного розчину натрію (200 ppm Na) Р 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої, що містить 1.27 мг цезію хлориду Р в 1 мл.

**Джерело випромінювання:** лампа із порожнистим натрієвим катодом.

**Довжина хвилі:** 330.3 нм.

**Генератор атомної пари:** полум'я підшого складу (наприклад, 11 л повітря і 2 л ацетилену протягом 1 хв).

▼ **Важкі метали (2.4.8, метод F).** Не більше 0.003 % (30 ppm).

1.0 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 3.0 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р. ▲

■

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 8.0 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 60 °С над фосфору(V) оксидом Р і тиску не більше 670 Па протягом 3 год.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.01 МО/МО гепарину, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять як зазначено у статті (2.7.5).

Встановлена активність має бути не менше 90 % і не більше 111 % заявленої активності. Довірчий ін-

тервал ( $P = 0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 80 % і не більше 125 % заявленої активності.

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному, повітронепроникному контейнері із контролем першого розкриття.

## МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- кількість МО/мг;
- $\blacktriangleright$  із яких видів тварин одержано субстанцію  $\blacktriangleleft$ ;
- де застосовно: субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

# ГЕПАРИНИ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ

## *Heparina massae molecularis minoris*

### HEPARINS, LOW-MOLECULAR-MASS

Солі сульфатованих глюкозаміногліканів із середньою (за масою) відносною молекулярною масою менше 8000, не менше 60 % загальної маси яких мають відносну молекулярну масу менше 8000. Низькомолекулярні гепарини мають різну хімічну структуру на кінці полісахаридних ланцюгів, що відновлює або не відновлює.

Активність не менше 70 МО активності анти-фактора Ха у міліграмі, у перерахунку на суху речовину. Відношення активності анти-фактора Ха до активності анти-фактора Іа, визначене, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», становить не менше 1.5.

## ВИРОБНИЦТВО

Низькомолекулярні гепарини одержують шляхом фракціонування або деполімерізації гепарину природного походження, що відповідає вимогам монографії *Гепарин натрію* або монографії *Гепарин кальцію*, що придатні для парентерального застосування, якщо не зазначене інше. Для кожного типу низькомолекулярного гепарину відтворюваність якості серій забезпечують доведенням, наприклад, того, що середня (за масою) відносна молекулярна маса

та масова частка гепаринів із відносною молекулярною масою менше 8000 становить не менше 75 % і не більше 125 % середнього значення, наведеного у відповідній специфікації. Такі самі межі застосовують для відношення активності анти-фактора Ха до активності анти-фактора Іа.

**Нуклеотидні та білкові домішки у вихідній сировині.** 40 мг вихідної сировини перед фракціонуванням розчиняють у 10 мл *води Р*. Оптична густина (2.2.25) одержаного розчину, виміряна за довжин хвиль 260 нм і 280 нм, має бути не більше 0.20 і 0.15, відповідно.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору. Гігроскопічний.

**Розчинність.** Легко розчинний у *воді Р*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Спектрометрія ядерного магнітного резонансу (2.2.33).

*Підготування зразка.* 0.200 г субстанції розчиняють у суміші 0.2 мл *дейтерію оксиду Р* і 0.8 мл *води Р*.

*Зразок порівняння.* 0.200 г підхожого стандартного зразка відповідного низькомолекулярного гепарину розчиняють у суміші 0.2 мл *дейтерію оксиду Р* і 0.8 мл *води Р*.

*Умови випробування:* використовують імпульсний (Фур'є-перетворення) спектрометр, що працює за частоти 75 МГц для  $^{13}\text{C}$ . Спектр записують при температурі 40 °С, використовуючи комірки діаметром 5 мм та *дейтерований метанол Р* як внутрішній стандарт при  $\delta$  50.0 (м.ч.) ppm.

*Результати:* одержаний спектр має відповідати спектру підхожого стандартного зразка відповідного низькомолекулярного гепарину.

**В.** Відношення активності анти-фактора Ха до активності анти-фактора Іа, визначене, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», становить не менше 1.5.

**С.** Ексклюзивна хроматографія (2.2.30).

*Випробовуваний розчин.* 20 мг субстанції розчиняють у 2 мл рухомої фази.

*Розчин порівняння.* 20 мг ФСЗ гепарину низькомолекулярного для калібрування розчиняють у 2 мл рухомої фази.

*Колонка:*

— *розмір:* 0.30 м × 7.5 мм;

— *неруха фаза:* підхожий пористий силікагель із розміром частинок 5 мкм, із діапазоном фракціонування для білків близько від 15000 до 100000;

## Гепарини низькомолекулярні

— число теоретичних тарілок: не менше 20000 на метр.

**Рухома фаза:** розчин 28.4 г/л натрію сульфату безводного Р, рН якого доводять до 5.0 килотою сірчаною розведеною Р.

**Швидкість рухомої фази:** 0.5 мл/хв.

**Детектор:** диференціальний рефрактометричний.

**Об'єм інжекції:** 25 мкл.

**Калібрування.** Використовують диференціальний рафрактометричний детектор (RI), з'єднаний із УФ-спектрофотометром (UV). Вимірювання проводять за довжини хвилі 234 нм. UV-монітор приєднаний до виходу із колонки, RI-детектор приєднаний до виходу із UV-монітора.

Якщо необхідно, для співставлення одержаних хроматограм точно вимірюють час затримки між 2 детекторами. Часи утримування, використані при калібруванні, мають бути такими самими, що і для RI-детектора.

Фактор нормалізації, що використовують для розрахунку відносної молекулярної маси із відношення RI/UV, обчислюють таким чином: розраховують загальну площу піків UV<sub>234</sub>-хроматограми (ΣUV<sub>234</sub>) і RI-хроматограми (ΣRI) шляхом чисельного інтегрування в досліджуваному діапазоні (тобто, виключають піки солі та розчинника у кінці хроматограми). Відношення *r* обчислюють за формулою:

$$\frac{\sum RI}{\sum UV_{234}}$$

Фактор *f* обчислюють за формулою:

$$\frac{M_{na}}{r}$$

де:

*M<sub>na</sub>* — середньочислова відносна молекулярна маса ФСЗ гепарину низькомолекулярного для калібрування, зазначена у супровідній документації.

Після того, як UV<sub>234</sub> і RI відклики вирівняні, відносну молекулярну масу (*M*) у будь-якій точці обчислюють за формулою:

$$f \frac{RI}{UV_{234}}$$

Кінцева таблиця часів утримування та відносних молекулярних мас може бути використана для калібрування хроматографічної системи шляхом підбору підходящої математичної залежності до експериментальних даних. Рекомендується використовувати поліном 3 ступеня. Слід зазначити, що екстраполяція одержаної калібрувальної залежності на більш високі значення молекулярної маси не є коректною.

Хроматографують 25 мкл випробовуваного розчину протягом часу, необхідного для повного виходу піків зразка та розчинника.

Середню (за масою) відносну молекулярну масу обчислюють за формулою:

$$\frac{\sum (RI_i M_i)}{\sum RI_i}$$

де:

*RI<sub>i</sub>* — маса субстанції, що елюється у фракції *i*;

*M<sub>i</sub>* — відносна молекулярна маса, що відповідає фракції *i*.

Будь-який низькомолекулярний гепарин, описаний в окремій статті, має відповідати вимогам ідентифікації С, зазначеним у відповідній монографії.

Якщо окрема стаття на низькомолекулярний гепарин відсутня, середня (за масою) відносна молекулярна маса має становити не більше 8000, і не менше 60 % загальної маси повинно мати відносну молекулярну масу менше 8000. Крім того, параметри молекулярної маси (середня (за масою) відносна молекулярна маса та масова частка ланцюгів, для яких встановлено межі) мають відповідати відповідним показникам препарату порівняння виробника.

**Д.** Субстанція дає реакцію (а) на натрій або реакції на кальцій (у залежності від вихідної сировини) (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**рН (2.2.3).** Від 5.5 до 8.0. 0.1 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Азот (2.5.9).** Від 1.5 % до 2.5 %, у перерахунку на суху речовину.

**Кальцій (2.5.11).** Від 9.5 % до 11.5 %, у перерахунку на суху речовину, якщо субстанція одержана із гепарину, що відповідає вимогам статті «Гепарин кальцію». Випробування проводять із 0.200 г субстанції.

**Натрій.** Від 9.5 % до 12.5 %, у перерахунку на суху речовину, якщо субстанція одержана із гепарину, що відповідає вимогам статті «Гепарин натрію».

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23. метод 1).

**Випробовуваний розчин.** 50 мг субстанції розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, що містить 1.27 мг цезію хлориду Р в 1 мл і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчини порівняння.** Розчини порівняння зі вмістом 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm Na готують відповідними розведеннями еталонного розчину натрію (200 ppm Na) Р 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої, що містить 1.27 мг цезію хлориду в 1 мл.

**Джерело випромінювання:** лампа із порожистим натрієвим катодом.

Довжина хвилі: 330.3 нм.

Спосіб атомізації: полум'я підхожого складу (наприклад, 1 л повітря і 2 л ацетилену протягом 1 хв).

Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів (2.2.38). Не менше 1.8.

Зразки гепарину, використовувані у даному титруванні, мають бути вільними від здатних до іонізації домішок, зокрема солей.

Зважують 0.100 г субстанції із необхідними застереженнями, що пов'язані із гігроскопічністю субстанції, поміщають у близько 20 мл двічі дистильованої у скляному пристрої води Р і охолоджують до температури 4 °С. 2.0 мл одержаного розчину вводять у передколону (розміром близько 10 см × 1 см), заповнену підхожою катіонообмінною смолою Р. Промивають колону двічі дистильованою у скляному пристрої водою Р, промивні води збирають у посудину для титрування до одержання кінцевого об'єму рідини близько 10-15 мл (посудина для титрування має бути достатньо великою, щоб вміщати електроди кондуктометра, невелику мішалку у вигляді стрижня та тонку гнучку трубку, приєднану до виходу із бюретки місткістю 2 мл). Одержану рідину перемішують за допомогою магнітної мішалки.

Коли показання кондуктометра стають сталими, записують їх і одержаний розчин титрують 0.05 М розчином натрію гідроксиду, додаючи порції близько 50 мкл. Відмічають рівень у бюретці та показання кондуктометра через кілька секунд після кожного додавання до досягнення кінцевої точки титрування.

Для кожного вимірювання обчислюють кількість міліеквівалентів доданого натрію гідроксиду із об'єму та відомої концентрації розчину натрію гідроксиду. Будують графік залежності електропровідності (вісь у) від міліеквівалентів натрію гідроксиду (вісь х). Графік повинен мати 3 майже лінійні ділянки: початкову — із крутим нисхідним нахилом, середню — із незначним підвищенням, кінцеву — із крутим підвищенням. Через кожну ділянку графіка проводять прямі лінії, що найбільше відповідають експериментальним точкам. У точках перетину 1<sup>ої</sup> та 2<sup>ої</sup> ліній, 2<sup>ої</sup> та 3<sup>ої</sup> ліній будують перпендикуляри до осі х для визначення точки, що відповідає кількості міліеквівалентів натрію гідроксиду. Точка перетину 1<sup>ої</sup> та 2<sup>ої</sup> ліній показує кількість міліеквівалентів натрію гідроксиду, що витрачена на титрування сульфатних груп. Точка перетину 2<sup>ої</sup> та 3<sup>ої</sup> ліній показує кількість міліеквівалентів, що витрачена на титрування сульфатних і карбоксильних груп разом. Різниця між цими значеннями є кількість міліеквівалентів, що витрачена на титрування карбоксильних груп.

Важкі метали (2.4.8, метод С). Не більше 0.003 % (30 ppm). 0.5 г субстанції мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із

використанням 1.5 мл еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 10.0 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 60 °С над фосфору(V) оксидом Р і тиску не більше 0.67 кПа протягом 3 год.

Бактеріальні ендотоксини (2.6.14). Менше 0.01 МО/МО анти-Ха активності, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів. Для виконання валідаційних критеріїв може бути необхідним додавання двовалентних катіонів.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Антикоагулянтну активність низькомолекулярних гепаринів визначають *in vitro* за допомогою 2 методик кількісного визначення, за якими визначається здатність гепаринів активувати пригнічення фактора Ха (кількісне визначення анти-Ха) і тромбіну, фактора ІІа (кількісне визначення анти-ІІа) за участю антитромбіну ІІІ.

Міжнародні одиниці анти-Ха активності та анти-ІІа активності відповідають активності певної кількості Міжнародного стандарту низькомолекулярного гепарину.

Як стандартний препарат використовують БСП гепарину низькомолекулярного для кількісного визначення, калібрований у Міжнародних одиницях шляхом порівняння із Міжнародним стандартним зразком із використанням двох методик кількісного визначення, що наведені нижче.

### АКТИВНІСТЬ АНТИ-ФАКТОРА Ха

Розчини стандартного препарату та випробовувані розчини

Готують 4 окремих серії 4 розведеннями субстанції та стандартного препарату у трис(гідроксиметил) амінометан-натрію хлорид буферному розчині рН 7.4 Р; їх концентрація має бути від 0.025 МО до 0.2 МО активності анти-фактора Ха у мілілітрі. Вибрані розведення мають давати лінійну залежність на графіку залежності оптичної густини від log концентрації.

### Методика

Маркують 16 пробірок : Т<sub>1</sub>, Т<sub>2</sub>, Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub> для розведень субстанції та S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> для розведень стандартного препарату у двох повторах. До кожної пробірки додають 50 мкл розчину антиромбіну ІІІ Р1 і 50 мкл відповідного розведення субстанції або стандартного препарату. Після кожного додавання перемішують, не допускаючи утворення бульбашок. Об-

## Гепарини низькомолекулярні

робляють пробірки у такому порядку:  $S_1, S_2, S_3, S_4, T_1, T_2, T_3, T_4, T_1, T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4$ , витримують пробірки при температурі  $37^\circ\text{C}$  (водяна баня або нагрівальний прилад) протягом 1 хв, додають у кожну пробірку 100 мкл розчину фактора Ха бичачого  $P$ , інкубують протягом точно 1 хв і додають 250 мкл хромогенного субстрату  $P1$ . Реакцію припиняють через точно 4 хв, додаючи 375 мкл кислоти оцтової  $P$ . Одержані суміші переносять у напівмікрокувети та вимірюють оптичну густину (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм. За тих самих умов проводять контрольний дослід із визначення амідолітичної активності на початку та наприкінці випробування, використовуючи замість розчину стандартного препарату та випробовуваного розчину *трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН 7.4 P*; 2 одержаних значення не мають значно відрізнятись. Розраховують лінійну залежність оптичної густини від  $\log$  концентрації розчину субстанції та розчину стандартного препарату й обчислюють активність субстанції в МО активності анти-фактора Ха у мілілітрі, використовуючи звичайні статистичні методи з використанням моделі паралельних ліній.

### АКТИВНІСТЬ АНТИ-ФАКТОРА IIa

#### Розчини стандартного препарату та випробовувані розчини

Готують 4 окремих серії 4 розведеннями субстанції та стандартного препарату у *трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферному розчині рН 7.4 P*, їх концентрація має бути від 0.015 МО до 0.075 МО активності анти-фактора IIa у мілілітрі. Вибрані розведення мають давати лінійну залежність на графіку залежності оптичної густини від  $\log$  концентрації.

#### Методика

Маркують 16 пробірок:  $T_1, T_2, T_3, T_4$  для розведень субстанції та  $S_1, S_2, S_3, S_4$  для розведень стандартного препарату у двох повторях. До кожної пробірки додають 50 мкл розчину антитромбіну III  $P2$  і 50 мкл підходячого розведення субстанції або стандартного препарату. Після кожного додавання перемішують, не допускаючи утворення бульбашок. Обробляють

пробірки у такому порядку:  $S_1, S_2, S_3, S_4, T_1, T_2, T_3, T_4, T_1, T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4$ , витримують пробірки при температурі  $37^\circ\text{C}$  (водяна баня або нагрівальний прилад) протягом 1 хв, додають у кожну пробірку 100 мкл розчину тромбіну людського  $P$ , інкубують протягом точно 1 хв і додають 250 мкл хромогенного субстрату  $P2$ . Реакцію припиняють через точно 4 хв, додаючи 375 мкл кислоти оцтової  $P$ . Одержані суміші переносять у напівмікрокувети та вимірюють оптичну густину (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм. За таких самих умов проводять контрольний дослід із визначення амідолітичної активності на початку та наприкінці випробування, використовуючи замість розчину стандартного препарату та випробовуваного розчину *трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН 7.4 P*; 2 одержаних значення не мають значно відрізнятись. Розраховують лінійну залежність оптичної густини від  $\log$  концентрації розчину субстанції та розчину стандартного препарату низькомолекулярних гепаринів й обчислюють активність субстанції в МО активності анти-фактора IIa у мілілітрі, використовуючи звичайні статистичні методи із використанням моделі паралельних ліній.

### МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- кількість МО активності анти-фактора Ха у міліграмі;
- кількість МО активності анти-фактора IIa у міліграмі;
- середню (за масою) відносну молекулярну масу та відсотковий вміст молекул із певним інтервалом молекулярних мас;

якщо необхідно:

- субстанція є натрієвою сіллю;
- субстанція є кальцієвою сіллю.

### ЗБЕРІГАННЯ

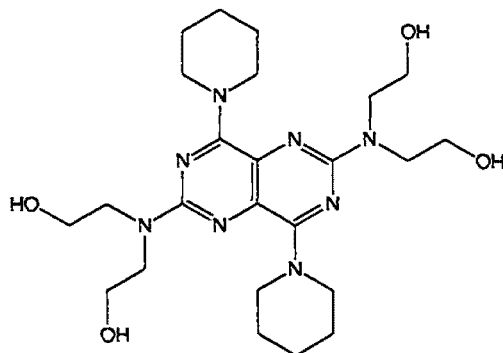
У повітронепроникному контейнері із контролем першого розкриття. Якщо субстанція стерильна та вільна від бактеріальних ендотоксинів, її зберігають у стерильному й апірогенному контейнері.

# Д

## ДИПІРИДАМОЛ

### Dipyridamolum

#### DIPYRIDAMOLE



$C_{24}H_{40}N_8O_4$   
[58-32-2]

М.м. 504.6

2,2',2'',2'''-[[4,8-Ди(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-d]піримідин-2,6-дііл]динітрило]тетраетанол.

*Вміст:* не менше 98.5 % і не більше 101.5 %, у перерахунку на суху речовину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Кристалічний порошок яскраво-жовтого кольору.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді *P*, легко розчинний в ацетоні *P*, розчинний в етанолі *P*.

(Розчиняється в розведених розчинах мінеральних кислот).

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

■

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Підготування зразка:* субстанцію досліджують у дисках із калію бромідом *P*.

*Відповідність спектру ФСЗ дипіридамо́лу.*

#### ВИПРОБУВАННЯ

▼ **Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29). Розчини готують безпосередньо перед використанням.

*Випробовуваний розчин.* 0.100 г субстанції розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

*Розчин порівняння (а).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* Вміст віалі ФСЗ дипіридамо́лу для ідентифікації піків (містить домішки А, В, С, D, Е і F) розчиняють в 1 мл метанолу *P*.

*Колонка:*

— розмір: 0.10 м × 4.0 мм;

— нерухома фаза: сферичний силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії *P* (5 мкм);

— температура: 45 °С.

*Рухома фаза:*

— рухома фаза А: 1.0 г калію дигідрофосфату *P* розчиняють у 900 мл води *P*, доводять рН розчину до 7.0 0.5 *M* розчином натрію гідроксиду та доводять об'єм розчину водою *P* до 1000 мл;

— рухома фаза В: метанол *P*;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 5	40	60
5 - 19	40 → 5	60 → 95
19 - 24	5 → 40	95 → 60
24 - 29	40	60

*Швидкість рухомої фази:* 1.2 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 295 нм.

*Об'єм інжекції:* 5 мкл.

*Ідентифікація домішок:* використовують хроматограму, що надається до ФСЗ дипіридамо́лу для ідентифікації піків, і хроматограму розчину порівняння (б) для ідентифікації піків домішок А, В, С, D, Е, і F.

*Відносні часи утримування до дипіридамо́лу (час утримування дипіридамо́лу близько 8 хв):* домішки В — близько 0.2; домішки F — близько 0.3; домішки D — близько 0.9; домішки Е — близько 1.3;



**Дипіридамола**

домішки С — близько 1.6; домішки А — близько 2.2.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

- **коефіцієнт розділення:** не менше 2.0 для піків домішки D і дипіридамолу;
- **відношення  $H_p$  до  $H_v$ :** становить не менше 4, де  $H_p$  — висота піка домішки В над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком домішки В і піком домішки F.

**Нормування:**

- **поправковий коефіцієнт:** для розрахунку вмісту множать площу піка домішки В на 1.7;
- **домішки А, В, С:** площа піка кожної домішки не має перевищувати 5 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);
- **домішки D, E:** площа піка кожної домішки не має перевищувати 2 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.2 %);
- **неспецифіковані домішки:** площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.10 %);
- **сума домішок:** сума площ піків не має перевищувати 10 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (1.0 %);
- **не враховують:** домішки, площа піка яких менше 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.05 %).▲

**Хлориди (2.4.4).** Не більше 0.02 % (200 ppm).

До 0.250 г субстанції додають 10 мл *води Р*, енергійно струшують і фільтрують. Фільтр промивають 5 мл *води Р*. Фільтрат і промивні води об'єднують і доводять *водою Р* до об'єму 15 мл. Одержаний розчин має витримувати випробування на хлориди.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

0.400 г субстанції розчиняють у 70 мл *метанолу Р* і титрують 0.1 М розчином *кислоти хлорної* потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0.1 М розчину *кислоти хлорної* відповідає 50.46 мг  $C_{24}H_{40}N_8O_4$ .

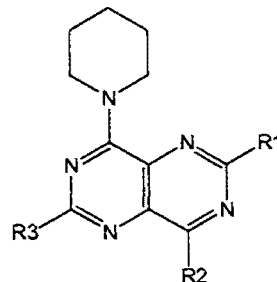
**ЗБЕРІГАННЯ**

У захищеному від світла місці.

**ДОМІШКИ**

**Специфіковані домішки: А, В, С, D, E.**

**Інші домішки, що визначаються** (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): F, G.



**A.** R1 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>, R2 = R3 = NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>: 2,2'-[[4,6,8-три(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2-іл]нітрило]діетанол,

**B.** R1 = R2 = R3 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>: 2,2',2'',2''',2''''-[8-(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2,4,6-трил]тринітрило]гексаетанол,

**C.** R1 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>, R2 = NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>, R3 = Cl: 2,2'-[[6-хлор-4,8-ди(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2-іл]нітрило]діетанол,

**D.** R1 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>, R2 = NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>, R3 = NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH: 2,2'-[[6-[(2-гідроксиетил)аміно]-4,8-ди(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2-іл]нітрило]діетанол,

**E.** R1 = R2 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>, R3 = NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>: 2,2',2'',2''''-[6,8-ди(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2,4-діл]динітрило]тетраетанол,

**F.** R1 = R3 = N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)<sub>2</sub>, R2 = NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH: 2,2',2'',2''''-[4-[(2-гідроксиетил)аміно]-8-піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин-2,6-діл]динітрило]тетраетанол,

**G.** R1 = R3 = Cl, R2 = NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>: 2,6-дихлор-4,8-ди(піперидин-1-іл)піримідо[5,4-*d*]піримідин.▲



## Інсулін аспартат

- *нерухома фаза*: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (3 мкм) із розміром пор 8 нм.
- *температура*: 40 °С.

### Рухама фаза:

- *рухама фаза А*: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 *P*, 700 мл води *P* і 100 мл ацетонітрилу для хроматографії *P*; фільтрують і дегазують;
- *рухама фаза В*: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 *P*, 400 мл води *P* і 400 мл ацетонітрилу для хроматографії *P*; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухама фаза А (% об/об)	Рухама фаза В (% об/об)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

*Швидкість рухомої фази*: 1 мл/хв.

*Детектування*: спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

*Урівноваження колонки*: не менше 15 хв за вихідних умов. Одержують хроматограму холостого розчину, використовуючи наведений вище градієнт.

*Об'єм інжекції*: 50 мкл.

### Придатність хроматографічної системи:

— хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння мають співпадати із хроматограмою інсуліну аспартату, що додається до ФСЗ інсуліну аспартату,

— на хроматограмі розчину порівняння ідентифікують піки, що відповідають фрагментам I, II і III:

*коефіцієнт симетрії*: не більше 1.5 для піків, що відповідають фрагментам II і III,

*коефіцієнт розділення*: не менше 8.0 для піків, що відповідають фрагментам II і III.

*Результати*: хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**ПРИМІТКА**: часи утримування фрагментів I, II і IV такі самі, що і для інсуліну людського. Час утримування фрагмента III відрізняється від інсуліну людського через те, що пролін замінений на кислоту аспарагінову.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну аспартату**. Ексклюзивна хроматографія (2.2.30). Використовують метод внутрішньої нормалізації.

*Випробовуваний розчин*. Готують розчин, що містить 4 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 *M* розчині

кислоти хлористоводневої. Одержаний розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год.

*Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи*. Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю 6 *M* розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних протеїнів, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 *M* розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом 10 діб. Одержаний розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 7 діб.

### Колонка:

- *розмір*: 0.3 м × 7.8 мм,
- *нерухома фаза*: силікагель гідрофільний для хроматографії *P* (5-10 мкм) із розміром пор (12-12.5) нм, підхожий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів.

*Рухама фаза*: кислота оцтова льодяна *P* - ацетонітрил для хроматографії *P* - розчин 1.0 г/л аргініну *P* (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

*Швидкість рухомої фази*: 0.5 мл/хв.

*Детектування*: спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

*Урівноваження колонки*: розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати.

*Об'єм інжекції*: 100 мкл.

*Час хроматографування*: близько 35 хв.

*Часи утримування*: полімери інсуліну аспартату — (13-17) хв, димер інсуліну аспартату — близько 17.5 хв; мономер інсуліну аспартату — близько 20 хв, солі — близько 22 хв.

*Придатність хроматографічної системи*: розчин для перевірки придатності хроматографічної системи: — *відношення  $H_p$  до  $H_m$* : не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_m$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком димеру та піком мономеру.

*Нормування*: сума площ піків із часом утримування меншим ніж час утримування основного піка не більше 0.5 % суми площ піків. Не враховують піки із часом утримування більшим ніж час утримування піка мономеру інсуліну аспартату.

**Супровідні білки**. Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Використовують метод внутрішньої нормалізації.

**Нормування:**

- *B28isoAsp* інсуліну аспартату: не більше 1.0 %;
- сума піків *A21Asp* інсуліну аспартату, *B3Asp* інсуліну аспартату та *B3isoAsp* інсуліну аспартату: не більше 2.0 %;
- сума інших домішок: не більше 1.5 %.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 0.200 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 24 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 6.0 %. Визначення проводять із 0.200 г субстанції (у перерахунку на суху речовину).

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 10 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** Субстанцію розчиняють в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл. Одержаний розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 24 год.

**Розчин порівняння.** Вміст віали *ФСЗ* інсуліну аспартату розчиняють в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл. Одержаний розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:** використовують підходящий розчин із вмістом *B3Asp* інсуліну аспартату та *A21Asp* інсуліну аспартату не менше 1 %. Він може бути одержаний витриманням розчину порівняння при кімнатній температурі протягом (1-3) діб. Одержаний розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 72 год.

**Колонка:**

- **розмір:** 0.25 м × 4 мм,
- **нерухома фаза:** силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (5 мкм),
- **температура:** 40 °С.

**Рухома фаза:**

- **рухома фаза А:** 142.0 г натрію сульфату безводного *P* розчиняють у воді *P*; додають 13.5 мл кислоти фосфорної *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 5000 мл; якщо необхідно, доводять до рН 3.6 розчином натрію гідроксиду концентрованим *P*; фільтрують і дегазують; готують суміш: одержаний розчин – ацетонітрил для хроматографії *P* (9:1); фільтрують і дегазують;

- **рухома фаза В:** змішують рівні об'єми води *P* і ацетонітрилу для хроматографії *P*; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 35	58	42
35 - 40	58 → 20	42 → 80
40 - 45	20	80
45 - 46	20 → 58	80 → 42
46 - 60	58	42

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Об'єм інжекції:** 10 мкл.

**Відносні часи утримання** до інсуліну аспартату (час утримання інсуліну аспартату 20-24 хв): *B28isoAsp* інсуліну аспартату – близько 0.9; *B3Asp* інсуліну аспартату у сумі із *A21Asp* інсуліном аспартатом (звичайно елюються спільно) – близько 1.3; *B3isoAsp* інсуліну аспартату – близько 1.5.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:

- **коефіцієнт розділення:** не менше 2.0 для піка інсуліну аспартату та піків *A21Asp* інсуліну аспартату та *B3Asp* інсуліну аспартату.

Вміст інсуліну аспартату  $C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$  у сумі із *B28isoAsp* інсуліном аспартатом, *A21Asp* інсуліном аспартатом, *B3Asp* інсуліном аспартатом і *B3isoAsp* інсуліном аспартатом визначають, використовуючи площі відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння та зазначений вміст інсуліну аспартату у сумі із *B28isoAsp* інсуліном аспартатом, *A21Asp* інсуліном аспартатом, *B3Asp* інсуліном аспартатом і *B3isoAsp* інсуліном аспартатом у *ФСЗ* інсуліну аспартату.

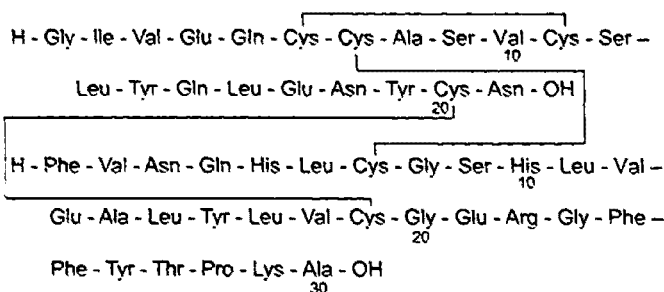
**ЗБЕРІГАННЯ**

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі – 18 °С або нижчій до використання у виробництві. Після розморожування інсулін аспартат зберігають при температурі (5±3) °С і використовують у виробництві протягом короткого періоду часу. Для запобігання абсорбції вологи повітря при зважуванні інсулін аспартат перед відкриттям контейнера має бути витриманий при кімнатній температурі.

## ІНСУЛІН БИЧАЧИЙ

## Insulinum bovinum

## INSULIN, BOVINE



М.м. 5734

Інсулін бичачий є натуральною антидіабетичною речовиною, одержаною із підшлункової залози биків або корів та очищеною.

## Вміст:

— інсулін бичачий ( $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ ) у сумі із А21 дезамідоінсуліном бичачим: від 93.0 % до 105 %, у перерахунку на суху речовину.

Умовно, для маркування препаратів інсуліну, приймають, що 0.0342 мг інсуліну бичачого відповідає 1 МО інсуліну.

## ВИРОБНИЦТВО

Тварини, від яких одержують інсулін бичачий, мають витримувати вимоги щодо здоров'я тварин, яких використовують для споживання людиною.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді Р та 96 % спирті Р. Розчиняється у розведених мінеральних кислотах і із розкладанням у розведених розчинах гідроксидів лужних металів.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має співпадати із часом утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с).

**В.** Пептидне картування.

**Випробовуваний розчин.** Готують розчин 2.0 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 М розчині кислоти

хлористоводневої. 500 мкл одержаного розчину переносять у чисту пробірку та додають 2.0 мл НЕРЕС буферного розчину рН 7.5 Р і 400 мкл розчину 1 мг/мл протеази *Staphylococcus aureus* штам V8, тип VХII-В Р. Пробірку закривають та інкубують при температурі 25 °С протягом 6 год. Реакцію зупиняють додаванням 2.9 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р.

**Розчин порівняння.** Готують аналогічно випробовуваному розчину, замість випробовуваної субстанції додають ФСЗ інсуліну бичачого.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

## Колонка:

- розмір: 0.10 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (3 мкм),
- температура: 40 °С.

## Рухома фаза:

- рухома фаза А: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 700 мл води Р, 100 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;
- рухома фаза В: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 400 мл води Р, 400 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Урівноваження колонки:** не менше 15 хв за вихідних умов. Хроматограму холостого розчину одержують, використовуючи наведений вище градієнт.

**Об'єм інжекції:** 50 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:** хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння мають співпадати із хроматограмою інсуліну бичачого, що додається до ФСЗ інсуліну бичачого. На хроматограмі розчину порівняння ідентифікують піки, що відповідають фрагментам І, ІІ і ІІІ. Коефіцієнт симетрії для піків, що відповідають фрагментам ІІ і ІІІ, має становити не більше 1.5. Коефіцієнт розділення для цих 2 піків має становити не менше 1.9.

**Результати:** хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**ПРИМІТКА:** час утримування фрагмента І однаковий для інсуліну свинячого та інсуліну людського. Часи

утримування фрагментів III і IV однакові для всіх інсулінів. Час утримування фрагмента III однаковий для інсуліну бичачого та для інсуліну свинячого.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну.** Ексклюзивна хроматографія (2.2.30). Використовують метод внутрішньої нормалізації. Розчини зберігають при температурі (2-10) °С і використовують протягом 7 діб. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-10) °С.

**Випробовуваний розчин.** 4 мг випробовуваної субстанції розчиняють в 1.0 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю 6 М розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом 10 діб.

**Колонка:**

- розмір: 0.3 м × 7.5 мм,
- нерухома фаза: силікагель гідрофільний для хроматографії Р (5-10 мкм), підходящий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ацетонітрил Р - розчин 1.0 г/л аргініну Р (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 0.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

**Урівноваження колонки:** нову колонку перед використанням врівноважують шляхом повторного хроматографування розчину інсуліну, що містить високомолекулярні протеїни. Для цього розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати.

**Об'єм інжекції:** 100 мкл.

**Час хроматографування:** близько 35 хв.

**Часи утримування:** полімерні комплекси інсуліну — (13-17) хв, ковалентний димер інсуліну — близько 17.5 хв; мономер інсуліну — близько 20 хв, солі — близько 22 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:

- хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення  $H_p$  до  $H_v$  не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком димеру та піком мономера.

**Нормування:** сума площ піків із часом утримування меншим, ніж час утримування основного піка становить не більше 1.0 % суми площ піків. Не враховують піки із часом утримування більшим, ніж час утримування піка інсуліну.

**Супровідні білки.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Використовують таку програму:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 30	42	58
30 - 44	42 → 11	58 → 89
44 - 50	11	89

**Розчини витримують при температурі (2-10) °С і використовують протягом 24 год.** Придатність хроматографічної системи (коефіцієнт розділення, лінійність) перевіряють, як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз для забезпечення повного виходу А21 дезамідоінсуліну свинячого перед початком градієнта. Профіль градієнта може бути відкорегований для забезпечення повного виходу всіх супровідних домішок інсуліну.

Хроматографують 20 мкл розчину порівняння (с) і 20 мкл випробовуваного розчину. Якщо необхідно, коригують об'єм інжекції у межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від виконання вимог із лінійності, як описано в розділі «Кількісне визначення». Хроматографують протягом близько 50 хв. На хроматограмі розчину порівняння (с) А21 дезамідоінсулін бичачий виявляється як невеликий пік після основного піка і має відносний час утримування по відношенню до основного піка близько 1.3.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка А21 дезамідоінсуліну бичачого не має перевищувати 3.0 % суми площ усіх піків; сума площ усіх піків, крім піків інсуліну бичачого та А21 дезамідоінсуліну бичачого, не має перевищувати 3.0 % суми площ усіх піків.

**Бичача проінсуліноподібна імунореактивність (PLI).** Не більше 0.001 % (10 ppm), у перерахунку на суху речовину.

Використовують імунохімічний метод із підходящою чутливістю (2.7.1), наприклад кількісне визначення радіоімунологічним методом. Для калібрування використовують Міжнародний Стандартний Реактив проінсуліну бичачого.

**Цинк.** Не більше 1.0 %, у перерахунку на суху речовину.

## Інсулін бичачий

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23, метод Л).

**Випробовуваний розчин.** 50.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25.0 мл. Якщо необхідно, доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до необхідної концентрації (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

**Розчини порівняння.** Свіжоприготовані розчини, що містять 0.40 мкг/мл Zn, 0.80 мкг/мл Zn, 1.00 мкг/мл Zn, 1.20 мкг/мл Zn, 1.60 мкг/мл Zn, готують відповідними розведеннями еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) Р 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої.

**Джерело випромінювання:** лампа із порожнистим цинковим катодом.

**Довжина хвилі:** 213.9 нм.

**Полум'я:** повітряно-ацетиленове підхожого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 0.200 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 24 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 2.5 %, у перерахунок на суху речовину. Визначення проводять із 0.200 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 10 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** Субстанцію розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (а).** Вміст віали ФСЗ інсуліну людського розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (b).** Вміст віали ФСЗ інсуліну свинячого розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (c).** Вміст віали ФСЗ інсуліну бичачого розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (d).** 1.0 мл розчину порівняння (c) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Змішують 1.0 мл розчину порівняння (а) і 1.0 мл розчину порівняння (b).

Розчини зберігають при температурі (2-10) °С і використовують протягом 48 год. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-10) °С.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм),
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:** рухома фаза А — рухома фаза В (42:58). Якщо необхідно, коригують склад суміші.

Наведені нижче розчини готують і зберігають при температурі не нижче 20 °С:

- рухома фаза А: 28.4 г натрію сульфату безводного Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл; додають 2.7 мл кислоти фосфорної Р; якщо необхідно, доводять до рН 2.3 етаноламіном Р; фільтрують і дегазують;
- рухома фаза В: змішують 550 мл рухомої фази А та 450 мл ацетонітрилу Р. Одержаний розчин нагрівають до температури не нижче 20 °С для запобігання утворенню осаду (змішування рухомої фази з ацетонітрилом є ендотермічним процесом); фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Придатність хроматографічної системи:**

- коефіцієнт розділення: хроматографують 20 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи та 20 мкл розчину порівняння (b). Час хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи має становити не менше часу, необхідного до повного виходу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b). На хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи ідентифікують піки, відповідні інсуліну свинячого та інсуліну людському. Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо коефіцієнт розділення для піків інсуліну людського та інсуліну свинячого становить не менше 1.2. Якщо необхідно, для досягнення належного розділення регулюють співвідношення рухомих фаз А і В;
- лінійність: хроматографують 20 мкл розчину порівняння (c) і 20 мкл розчину порівняння (d). Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо площа основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) становить (10±0.5) площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d). Якщо ця умова не виконується, коригують об'єм інжекції в межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від ступеня лінійності сигналу детектора.

Об'єм інжекції: 20 мл випробовуваного розчину.

Вміст інсуліну бичачого  $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$  у сумі із А21 дезамідоінсуліном бичачим визначають, використовуючи площу основного піка та площу піка А21 дезамідоінсуліну бичачого на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння (с) і зазначений вміст інсуліну бичачого у сумі із А21 дезамідоінсуліном бичачим у ФСЗ інсуліну бичачого.

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі нижче  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до використання у виробництві. Після розморожування інсулін зберігають при температурі  $(5\pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  і використовують у виробництві протягом короткого періоду часу. Для запобігання абсорбції вологи повітря при зважуванні інсулін перед відкриванням контейнера має бути витриманий при кімнатній температурі.

## ІНСУЛІН ДВОФАЗОВИЙ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Insulinum biphasicum iniectabile

#### INSULIN INJECTION, BIPHASIC

*Інсулін двофазовий для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій» та наведеним нижче вимогам.*

Інсулін двофазовий для ін'єкцій є стерильною суспензією кристалів інсуліну бичачого у розчині інсуліну свинячого.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Суспензія білого або майже білого кольору. Під мікроскопом більшість частинок виглядають як ромбодраляні кристали, що мають розмір від кута до кута через кристал більше 10 мкм, але зрідка перевищують 40 мкм.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

На хроматограмі випробовуваного розчину піки двох інсулінів мають відповідати основним пікам на хроматограмі відповідного розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

pH (2.2.3). Від 6.6 до 7.2.

Інсулін у надосадовій рідині. Від 22.0 % до 28.0 %. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

Загальний цинк. Від 26.0 мкг/100 МО інсуліну до 37.5 мкг/100 МО інсуліну. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

## ІНСУЛІН ІЗОФАНОВИЙ ДВОФАЗОВИЙ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Insulinum isophanum biphasicum iniectabile

#### INSULIN INJECTION, BIPHASIC ISOPHANE

*Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій», за винятком випробування «Інсулін у надосадовій рідині», із урахуванням додаткових вимог, зазначених нижче.*

Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій є стерильною забуференою суспензією свинячого або людського інсуліну, у комплексі із протаміну сульфатом або іншим підходящим протаміном у розчині інсуліну одного із цих видів.

#### ВИРОБНИЦТВО

Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій готують, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій одержують змішуванням у певних співвідношеннях розчину інсуліну для ін'єкцій та інсуліну ізофанового для ін'єкцій. Ці співвідношення мають бути зазначені у маркуванні та контролюватися методом, встановленим компетентним уповноваженим органом.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Суспензія білого або майже білого кольору, при відстоюванні якої утворюється білий або майже білий осад і безбарвна або майже безбарвна надосадова рідина; осад легко ресуспендується при обережному струшуванні. Під мікроскопом частинки виглядають як стрижнеподібні кристали, більшість яких мають





дисульфідних зв'язки та 1 дисульфідний зв'язок у межах ланцюга.

**Вміст:** від 94.0 % до 104 %, у перерахунку на суху речовину.

Умовно, для маркування препаратів інсуліну лізпро, приймають, що 0.0347 мг інсуліну лізпро відповідає 1 МО інсуліну.

## ВИРОБНИЦТВО

Інсулін лізпро одержують за допомогою технології рекомбінантної ДНК (р-ДНК) за умов, що мінімізують ризик мікробіологічного забруднення.

Попередньо для кожної серії кінцевого нерозфасованого продукту проводять наведені нижче випробування. Дані випробування не проводять, якщо відповідність даному випробуванню гарантовано компетентним уповноваженим органом.

**Залишкові білки клітини-хазяїна.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Одноланцюговий попередник.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом. Використовують метод із піджою чутливістю.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді *P* та 96 % спирті *P*. Розчиняється у розведених мінеральних кислотах і із розкладанням у розведених розчинах гідроксидів лужних металів.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має співпадати із часом утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

**B.** Пептидне картування (2.2.55).

## СЕЛЕКТИВНИЙ РОЗРИВ ПЕПТИДНИХ ЗВ'ЯЗКІВ

**Випробовуваний розчин.** Готують розчин 2.0 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 *M* розчині кислоти хлористоводневої, 500 мкл одержаного розчину переносять у чисту пробірку і додають 2.0 мл *HEPES* буферного розчину рН 7.5 *P* і 400 мкл розчину 1 мг/мл протеази *Staphylococcus aureus* штаму *V8*, тип *XVII-B P*. Пробірку закривають та інкубують при температурі 25 °С протягом 6 год. Реакцію зупиня-

ють додаванням 2.9 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 *P*.

**Розчин порівняння.** Готують аналогічно випробовуваному розчину, замість випробовуваної субстанції додають *ФСЗ інсуліну лізпро*.

## ХРОМАТОГРАФІЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Колонка:**

- розмір: 0.10 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії *P* (3 мкм) із розміром пор 8 нм,
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза *A*: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 *P*, 700 мл води *P* і 100 мл ацетонітрилу для хроматографії *P*; фільтрують і дегазують;
- рухома фаза *B*: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 *P*, 400 мл води *P* і 400 мл ацетонітрилу для хроматографії *P*; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Урівноваження колонки:** не менше 15 хв за вихідних умов. Одержують хроматограму холостого розчину, використовуючи наведений вище градієнт.

**Об'єм інжекції:** 50 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:**

- хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння мають співпадати із хроматограмою інсуліну лізпро, що додається до *ФСЗ інсуліну лізпро*,
- на хроматограмі розчину порівняння ідентифікують піки, що відповідають фрагментам I, II і III:
- коефіцієнт симетрії: не більше 1.5 для піків, що відповідають фрагментам II і III,
- коефіцієнт розділення: не менше 8 для піків, що відповідають фрагментам II і III.

**Результати:** хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**ПРИМІТКА:** часи утримування фрагментів I, II і IV однакові для інсуліну лізпро та для інсуліну людського. Час утримування фрагмента III відрізняється від інсуліну людського порядком паложень 28 і 29 В-ланцюга.

## ВИПРОБУВАННЯ

Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну лізпро. Ексклюзивна хроматографія (2.2.30). Використовують метод внутрішньої нормалізації.

**Випробовуваний розчин.** Готують розчин, що містить 4 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю 6 М розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом 10 діб. Розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 8 діб.

**Колонка:**

- розмір: 0.30 м × 7.5 мм,
- нерухома фаза: силікагель гідрофільний для хроматографії Р (5-10 мкм) із розміром пор (12-12.5) мкм, підхожий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ацетонітрил для хроматографії Р - розчин 1.0 г/л аргініну Р (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 0.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

**Урівноваження колонки:** Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати.

**Об'єм інжекції:** 100 мкл.

**Час хроматографування:** близько 35 хв.

**Часи утримування:** полімери інсуліну лізпро — (13-17) хв, димер інсуліну лізпро — близько 17.5 хв; мономер інсуліну лізпро — близько 20 хв, солі — близько 22 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин для перевірки придатності хроматографічної системи: — хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення  $H_p$  до  $H_v$  не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією найнижчої точки

хроматограми між піком димеру та піком мономера.

- коефіцієнт симетрії: не більше 2.0 для піка інсуліну лізпро.

**Нормування:** сума площ піків із часом утримування меншим ніж час утримування основного піка не більше 0.25 % суми площ піків. Не враховують піки із часом утримування більшим, ніж час утримування піка мономера інсуліну лізпро.

**Супровідні білки.** Рідинна хроматографія (2.2.29). Використовують метод внутрішньої нормалізації.

**Випробовуваний розчин.** 3.5 мг субстанції розчиняють в 1.0 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої. Розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 56 год.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** 3.5 мг субстанції розчиняють в 1.0 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої і витримують при кімнатній температурі до одержання розчину із вмістом А21 дезамідоінсуліну лізпро від 0.8 % до 11 %.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкл) із розміром пор 30 нм,
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: розчин 28.4 г/л натрію сульфату безводного Р, рН якого доведено до 2.3 кислотою фосфорною Р, — ацетонітрил для хроматографії Р (82:18). Одержану суміш фільтрують і дегазують;
- рухома фаза В: суміш рівних об'ємів розчину 28.4 г/л натрію сульфату безводного Р, рН якого доведено до 2.3 кислотою фосфорною Р, і ацетонітрилу для хроматографії Р. Одержану суміш фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 60	81	19
60 - 83	81 → 51	19 → 49
83 - 84	51 → 81	49 → 19
84 - 94	81	19

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Об'єм інжекції:** 20 мкл.

**Часи утримування:** коригують склад рухомої фази до одержання часу утримування для інсуліну лізпро близько 41 хв; А21 дезамідоінсулін лізпро елюється перед початком градієнта.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин для перевірки ступеня розділення:

- коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для 1<sup>го</sup> піка (інсулін лізпро) і 2<sup>го</sup> піка (А21 дезамідоінсулін лізпро).

— коефіцієнт симетрії: не більше 2.0 для піка інсуліну лізпро.

#### Нормування:

- А21 дезамідоінсулін лізпро: не більше 1.0 %,
- будь-яка інша домішка: не більше 0.50 %,
- сума домішок (за виключенням А21): не більше 2.0 %.

**Цинк.** Не більше 1.0 %, у перерахунку на суху речовину.

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23, метод І).

*Випробовуваний розчин.* 50 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25 мл. Якщо необхідно, розводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до необхідної концентрації (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 0.6 мкг/мл Zn).

*Розчини порівняння.* Використовують свіжоприготовані розчини із концентраціями, що охоплюють передбачені концентрації Zn у випробовуваному розчині, наприклад, від 0.2 мкг/мл Zn до 0.8 мкг/мл Zn, приготовані розведеннями еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) Р 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої.

*Джерело випромінювання:* лампа із порожнистим цинковим катодом.

*Довжина хвилі:* 213.9 нм.

*Полум'я:* повітряно-ацетиленове підходячого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 0.200 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 16 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 2.5 %, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять із 0.200 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14, метод D).** Менше 10 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Субстанцію розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 0.8 мг/мл. Розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год.

*Розчин порівняння.* Вміст віалі ФСЗ інсуліну лізпро розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 0.8 мг/мл. Одержаний розчин

зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год.

*Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.* Близько 10 мг субстанції розчиняють у 10 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої та витримують при кімнатній температурі до одержання розчину із вмістом А21 дезамідоінсуліну лізпро від 0.8 % до 11 %. Розчин зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 14 діб.

*Колонка:*

- розмір: 0.10 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (3 мкл) із розміром пор 8 нм,
- температура: 40 °С.

*Рухома фаза:* розчин 28.4 г/л натрію сульфату безводного Р, рН якого доведено до 2.3 кислотою фосфорною Р, - ацетонітрил для хроматографії Р (745:255). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

*Швидкість рухомої фази:* 0.8 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

*Об'єм інжекції:* 20 мкл.

*Час утримування:* інсуліну лізпро близько 24 хв.

*Придатність хроматографічної системи:*

- коефіцієнт розділення: не менше 1.8 для 1<sup>го</sup> піка (інсулін лізпро) і 2<sup>го</sup> піка (А21 дезамідоінсулін лізпро) на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи,
- збіжність: максимальне стандартне відхилення після 3 інжекцій розчину порівняння не більше 1.1 %.

Вміст інсуліну лізпро  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$  визначають, використовуючи хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння та зазначений вміст  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$  у ФСЗ інсуліну лізпро.

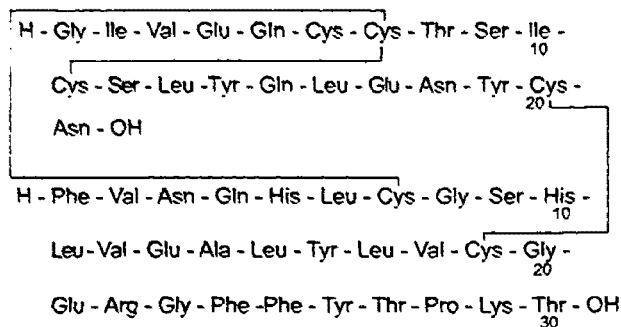
## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі — 18 °С або нижчій. Після розморожування інсулін лізпро зберігають і зважують у визначених виробником умовах, що гарантують якість субстанції, та використовують у виробництві протягом короткого періоду часу. Для запобігання абсорбції вологи повітря при зважуванні інсулін лізпро перед відкриванням контейнера має бути витриманий при кімнатній температурі.

## ІНСУЛІН ЛЮДСЬКИЙ

## Insulinum humanum

## INSULIN, HUMAN



М.м. 5808

Інсулін людський є дволанцюговим пептидом, який має структуру антидіабетичного гормону, що продукується підшлунковою залозою людини.

**Вміст:** від 95.0 % до 105 % інсуліну людського  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$  у сумі із А21 дезамідоінсуліном людським, у перерахунку на суху речовину.

Умовно, для маркування препаратів інсуліну, приймають, що 0.0347 мг інсуліну людського відповідає 1 МО інсуліну.

## ВИРОБНИЦТВО

Інсулін людський одержують ферментативною модифікацією та відповідним очищенням інсуліну із підшлункових залоз свиней або за допомогою технології рекомбінантної ДНК (р-ДНК).

Інсулін людський одержують за умов, що мінімізують ризик мікробіологічного забруднення.

Де застосовно, тварини, від яких одержують інсулін людський, мають витримувати вимоги щодо здоров'я тварин, яких використовують для споживання людиною.

Для інсуліну людського, одержаного ферментативною модифікацією інсуліну із підшлункових залоз свиней, процес виробництва має бути валідованим, щоб продемонструвати, що будь-яка остаточно протеолітична активність виключена. Компетентний уповноважений орган може затребувати додаткові випробування.

Для інсуліну людського, одержаного за допомогою технології рекомбінантної ДНК (р-ДНК), попередньо для кожної серії кінцевого нерозфасованого продукту проводять наведені нижче випробування. Дані випробування не проводять, якщо відповідність даному випробуванню гарантовано компетентним уповноваженим органом.

**Залишкові білки клітини-хазяїна.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Одноланцюговий попередник.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом. Використовують метод із підхожою чутливістю.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді Р та 96 % спирті Р. Розчиняється у розведених мінеральних кислотах і із розкладанням у розведених розчинах гідроксидів лужних металів.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має співпадати із часом утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

**В.** Пептидне картування (2.2.55).

## СЕЛЕКТИВНИЙ РОЗРИВ ПЕПТИДНИХ ЗВ'ЯЗКІВ

**Випробовуваний розчин.** Готують розчин 2.0 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої, 500 мкл одержаного розчину переносять у чисту пробірку і додають 2.0 мл *HEPES* буферного розчину рН 7.5 Р і 400 мкл розчину 1 мг/мл протеази *Staphylococcus aureus* штам V8, тип XVII-В Р. Пробірку закривають та інкубують при температурі 25 °С протягом 6 год. Реакцію зупиняють додаванням 2.9 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р.

**Розчин порівняння.** Готують аналогічно випробовуваному розчину, замість випробовуваної субстанції додають ФСЗ інсуліну людського.

**ХРОМАТОГРАФІЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Колонка:**

- розмір: 0.10 м × 4.6 мм.
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (3 мкм) із розміром пор 8 нм.
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 700 мл води Р і 100 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;

— рухома фаза В: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 400 мл води Р, 400 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

Швидкість рухомої фази: 1 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

Урівноваження колонки: не менше 15 хв за вихідних умов. Хроматограму холостого розчину одержують, використовуючи наведений вище градієнт.

Об'єм інжекції: 50 мкл.

Придатність хроматографічної системи:

- хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння мають співпадати із хроматограмою інсуліну людського, що додається до ФСЗ інсуліну людського,
- на хроматограмі розчину порівняння ідентифікують піки, що відповідають фрагментам I, II і III:
- коефіцієнт симетрії: не більше 1.5 для піків, що відповідають фрагментам II і III,
- коефіцієнт розділення: не менше 3.4 для піків, що відповідають фрагментам II і III.

Результати: хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**ПРИМІТКА:** час утримування фрагмента I однаковий для інсуліну свинячого та для інсуліну людського. Час утримування фрагментів II і IV однакові для всіх інсулінів. Час утримування фрагмента III однаковий для інсуліну бичачого та для інсуліну свинячого.

## ВИПРОБУВАННЯ

Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну. Ексклюзивна хроматографія (2.2.30). Використовують метод внутрішньої нормалізації.

Випробовуваний розчин. Готують розчин, що містить 4 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю б М розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений

відсотковий вміст високомолекулярних білків, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом 10 діб.

Розчини зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 7 діб. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-8) °С.

Колонка:

- розмір: 0.3 м × 7.5 мм,
- нерухома фаза: силікагель гідрофільний для хроматографії Р (5-10 мкм) із розміром пор (12-12.5) нм, підходящий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів.

Рухома фаза: кислота оцтова льодяна Р - ацетонітрил Р - розчин 1.0 г/л аргініну Р (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

Швидкість рухомої фази: 0.5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

Урівноваження колонки: нову колонку перед використанням врівноважують шляхом повторного хроматографування розчину інсуліну, що містить високомолекулярні протеїни. Для цього розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати.

Об'єм інжекції: 100 мкл.

Час хроматографування: близько 35 хв.

Часи утримування: полімерні комплекси інсуліну — (13-17) хв, ковалентний димер інсуліну - близько 17.5 хв; мономер інсуліну — близько 20 хв, солі — близько 22 хв.

Придатність хроматографічної системи: розчин для перевірки придатності хроматографічної системи: — хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення  $H_p$  до  $H_v$  становить не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком димеру і піком мономеру.

Нормування: сума площ піків із часом утримування меншим ніж час утримування основного піка становить не більше 1.0 % суми площ піків. Не враховують піки із часом утримування більшим, ніж час утримування піка інсуліну.

Супровідні білки. Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Використовують таку програму:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 30	42	58
30 - 44	42 → 11	58 → 89
44 - 50	11	89

## Інсулін людський

Розчини витримують при температурі (2-8) °С і використовують протягом 24 год. Придатність хроматографічної системи (коефіцієнт розділення, лінійність) перевіряють, як описано в розділі «Кількісне визначення». Якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз для забезпечення повного виходу А21 дезамідоінсуліну свинячого перед початком градієнта. Профіль градієнта може бути откорегований для забезпечення повного виходу всіх супровідних домішок інсуліну.

Хроматографують 20 мкл розчину порівняння (а), 20 мкл розчину порівняння (b), 20 мкл розчину порівняння (с) і 20 мкл випробовуваного розчину. Якщо необхідно, коригують об'єм інжекції у межах від 10 мкл і 20 мкл залежно від виконання вимог із лінійності, як описано в розділі «Кількісне визначення». Хроматографують протягом близько 50 хв. На хроматограмі розчину порівняння (а) А21 дезамідоінсулін людський виявляється як невеликий пік після основного піка і має відносний час утримування по відношенню до основного піка близько 1.3.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка А21 дезамідоінсуліну людського не має перевищувати 2.0 % суми площ усіх піків; сума площ усіх піків, крім піків інсуліну людського та А21 дезамідоінсуліну людського, не має перевищувати 2.0 % суми площ усіх піків.

Для напівсинтетичного інсуліну людського: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, що відповідає основному піку на хроматограмі розчину порівняння (b), не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (1.0 % інсуліну свинячого в інсуліні людському).

Наведене нижче випробування проводять тільки для інсуліну людського, одержаного ферментативною модифікацією інсуліну свинячого.

**Проінсуліноподібна імунореактивність (PLI).** Не більше 0.001 % (10 ppm), у перерахунку на суху речовину.

Використовують імунохімічний метод із підхожою чутливістю (2.7.1), наприклад кількісне визначення радіоімунологічним методом. Для калібрування використовують Міжнародний Стандартний Реактив проінсуліну свинячого.

**Цинк.** Не більше 1.0 %, у перерахунку на суху речовину.

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23, метод I).

**Випробовуваний розчин.** 50.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25.0 мл. Якщо необхідно, доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до необхідної концентрації (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

**Розчини порівняння.** Свіжоприготовані розчини, що містять 0.40 мкг/мл Zn, 0.80 мкг/мл Zn, 1.00 мкг/мл

Zn, 1.20 мкг/мл Zn, 1.60 мкг/мл Zn, готують відповідними розведеннями *еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої*.

**Джерело випромінювання:** лампа із порожнистим цинковим катодом.

**Довжина хвилі:** 213.9 нм.

**Полум'я:** повітряно-ацетиленове підхожого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 0.200 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 24 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 2.5 %, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять із 0.200 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 10 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** 40.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** Вміст віали ФСЗ інсуліну людського розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (b).** Вміст віали ФСЗ інсуліну свинячого розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (с).** 1.0 мл розчину порівняння (b) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл. До 1.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл розчину порівняння (а).

**Розчин порівняння (d).** 1.0 мл розчину порівняння (а) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:** змішують 1.0 мл розчину порівняння (а) і 1.0 мл розчину порівняння (b).

Розчини зберігають при температурі (2-8) °С і використовують протягом 48 год. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-8) °С.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм.

- *нерухома фаза*: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм),
- *температура*: 40 °С.

*Рухома фаза*: рухома фаза А — рухома фаза В (42:58), якщо необхідно, коригують склад суміші.

Наведені нижче розчини готують і витримують при температурі не нижче 20 °С:

- *рухома фаза А*: 28.4 г натрію сульфату безводного Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл; додають 2.7 мл кислоти фосфорної Р; якщо необхідно, доводять до рН 2.3 етаноламіном Р; фільтрують і дегазують;
- *рухома фаза В*: змішують 550 мл рухомої фази А та 450 мл ацетонітрилу Р. Одержаний розчин нагрівають до температури не нижче 20 °С для запобігання утворенню осаду (змішування рухомої фази з ацетонітрилом є ендотермічним процесом); фільтрують і дегазують.

*Швидкість рухомої фази*: 1 мл/хв.

*Детектування*: спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

*Придатність хроматографічної системи*:

- *коефіцієнт розділення*: хроматографують 20 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи та 20 мкл розчину порівняння (b). Час хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи має становити не менше часу, необхідного до повного виходу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b). На хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи ідентифікують піки, відповідні інсуліну свинячого та інсуліну людського. Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо коефіцієнт розділення для піків інсуліну людського та інсуліну свинячого становить не менше 1.2. Якщо необхідно, для досягнення належного розділення регулюють співвідношення рухомих фаз А і В;
- *лінійність*: хроматографують 20 мкл розчину порівняння (a) і 20 мкл розчину порівняння (d). Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо площа основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) становить  $(10 \pm 0.5)$  площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d). Якщо ця умова не виконується, коригують об'єм інжекції в межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від ступеня лінійності сигналу детектора.

*Об'єм інжекції*: 20 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння (a).

Вміст інсуліну людського  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$  у сумі із А21 дезамідоінсуліном людським визначають, використовуючи площі відповідних піків на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння (a) та зазначений вміст інсуліну людського у сумі із А21 дезамідоінсуліном людським у ФСЗ інсуліну людського.

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі — 18 °С або нижчій до використання у виробництві. Після розморожування інсулін зберігають при температурі  $(5 \pm 3)$  °С і використовують у виробництві протягом короткого періоду часу. Для запобігання абсорбції вологи повітря при зважуванні перед відкриванням контейнера інсулін має бути витриманий при кімнатній температурі.

## МАРКУВАННЯ

Зазначають: яким саме способом одержують субстанцію: ферментативною модифікацією інсуліну свинячого або за допомогою р-ДНК-технології.

# ІНСУЛІН РОЗЧИННИЙ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

## Insulinum solubile iniectionabile

### INSULIN INJECTION, SOLUBLE

*Інсулін розчинний для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій» з урахуванням додаткових вимог, зазначених нижче.*

Інсулін розчинний для ін'єкцій є нейтральним стерильним розчином інсуліну свинячого, свинячого або людського.

### ВЛАСТИВОСТІ

Рідина безбарвна, вільна від опалесценції та сторонніх частинок; протягом зберігання може випасти незначна кількість дуже дрібного осаду.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

На хроматограмі випробовуваного розчину пік інсуліну має відповідати основному піку на хроматограмі відповідного розчину порівняння.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Загальний цинк.** Не більше 40.0 мкг/100 МО інсуліну.



## ІНСУЛІН СВИНЯЧИЙ

Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

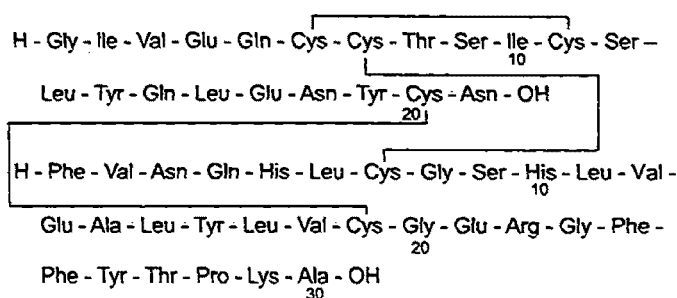
Використовують такий випробовуваний розчин.

**Випробовуваний розчин.** Препарат обережно перемішують. Об'єм препарату, що відповідає 200 МО інсуліну, доводять водою Р до об'єму 25.0 мл. Якщо необхідно, доводять водою Р до необхідної концентрації цинку (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

## ІНСУЛІН СВИНЯЧИЙ

### Insulinum porcinum

#### INSULIN, PORCINE



М.м. 5778

Інсулін свиначий є натуральною антидіабетичною речовиною, одержаною із підшлункової залози свиней та очищеною.

**Вміст:**

— інсулін свиначий ( $C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$ ) у сумі із А21 дезамідоінсуліном свиначим: від 95.0 % до 105 %, у перерахунку на суху речовину.

Умовно, для маркування препаратів інсуліну, приймають, що 0.0345 мг інсуліну свиначого відповідає 1 МО інсуліну.

#### ВИРОБНИЦТВО

Тварини, від яких одержують інсулін свиначий, мають витримувати вимоги щодо здоров'я тварин, яких використовують для споживання людиною.

#### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Практично не розчинний у воді Р та 96 % спирті Р. Розчиняється у розведених мінеральних кислотах і із розкладанням у розведених розчинах гідроксидів лужних металів.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має співпадати із часом утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b).

**В.** Пептидне картування.

**Випробовуваний розчин.** Готують розчин 2.0 мг/мл випробовуваної субстанції в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої, 500 мкл одержаного розчину переносять у чисту пробірку і додають 2.0 мл *HEPES* буферного розчину рН 7.5 Р і 400 мкл розчину 1 мг/мл протеази *Staphylococcus aureus* штам V8, тип XVII-B Р. Пробірку закривають та інкубують при температурі 25 °С протягом 6 год. Реакцію зупиняють додаванням 2.9 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р.

**Розчин порівняння.** Готують аналогічно випробовуваному розчину, замість випробовуваної субстанції додають ФСЗ інсуліну свиначого.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

**Колонка:**

- розмір: 0.10 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (3 мкм),
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 700 мл води Р та 100 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;
- рухома фаза В: змішують 200 мл сульфатного буферного розчину рН 2.0 Р, 400 мл води Р та 400 мл ацетонітрилу для хроматографії Р; фільтрують і дегазують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

**Швидкість рухомої фази:** 1мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Урівноваження колонки:** не менше 15 хв за вихідних умов. Хроматограму холостого розчину одержують, використовуючи наведений вище градієнт.

**Об'єм інжекції:** 50 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:** хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння мають співпадати із хроматограмою інсуліну

свинячого, що додається до ФСЗ інсуліну свинячого. На хроматограмі розчину порівняння ідентифікують піки, що відповідають фрагментам I, II і III. Коефіцієнт симетрії для піків, що відповідають фрагментам II і III, має становити не більше 1.5. Коефіцієнт розділення для цих 2 піків має становити не менше 1.9.

**Результати:** хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**ПРИМІТКА:** час утримування фрагмента I однаковий для інсуліну свинячого та інсуліну людського. Час утримування фрагментів II і IV однакові для всіх інсулінів. Час утримування фрагмента III однаковий для інсуліну бичачого та для інсуліну свинячого.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну.** Ексклюзивна хроматографія (2.2.30). Використовують метод внутрішньої нормалізації. Розчини зберігають при температурі (2-10) °C і використовують протягом 7 діб. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-10) °C.

**Випробовуваний розчин.** 4 мг випробовуваної субстанції розчиняють в 1.0 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю 6 М розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом 10 діб.

**Колонка:**

- розмір: 0.3 м × 7.5 мм,
- нерухома фаза: силікагель гідрофільний для хроматографії Р (5-10 мкм), підходящий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів.

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ацетонітрил Р - розчин 1.0 г/л аргініну Р (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 0.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

**Урівноваження колонки:** нову колонку перед використанням врівноважують шляхом повторного хроматографування розчину інсуліну, що містить

високомолекулярні протеїни. Для цього розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати.

**Об'єм інжекції:** 100 мкл.

**Час хроматографування:** близько 35 хв.

**Часи утримування:** полімерні комплекси інсуліну — (13-17) хв, ковалентний димер інсуліну — близько 17.5 хв; мономер інсуліну — близько 20 хв, солі — близько 22 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин для перевірки придатності хроматографічної системи: — хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення  $H_p$  до  $H_v$  не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком димеру та піком мономеру.

**Нормування:** сума площ піків із часом утримування меншим, ніж час утримування основного піка становить не більше 1.0 % суми площ піків. Не враховують піки із часом утримування більшим, ніж час утримування піка інсуліну.

**Супровідні білки.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Використовують таку програму:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 30	42	58
30 - 44	42 → 11	58 → 89
44 - 50	11	89

**Розчини витримують при температурі (2-10) °C і використовують протягом 24 год.** Придатність хроматографічної системи (коефіцієнт розділення, лінійність) перевіряють, як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз для забезпечення повного виходу А21 дезамідоінсуліну свинячого перед початком градієнта. Профіль градієнта може бути відкорегований для забезпечення повного виходу всіх супровідних домішок інсуліну.

Хроматографують 20 мкл розчину порівняння (b) і 20 мкл випробовуваного розчину. Якщо необхідно, коригують об'єм інжекції у межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від виконання вимог із лінійності, як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Хроматографують протягом близько 50 хв. На хроматограмі розчину порівняння (b) А21 дезамідоінсулін свинячий виявляється як невеликий пік після основного піка і має відносний час утримування по відношенню до основного піка близько 1.3.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка А21 дезамідоінсуліну свинячого не має перевищувати 2.0 % суми площ усіх піків; сума площ усіх

## Інсулін свинячий

пиків, крім пиків інсуліну свинячого та А21 дезамідоінсуліну свинячого, не має перевищувати 2.0 % суми площ усіх пиків.

**Свиняча проінсуліноподібна імунореактивність (PLI).** Не більше 0.0010 % (10 ppm), у перерахунку на суху речовину.

Використовують імунохімічний метод із підходящою чутливістю (2.7.1), наприклад кількісне визначення радіоімунологічним методом. Для калібрування використовують Міжнародний Стандартний Реактив проінсуліну свинячого.

**Цинк.** Не більше 1.0 %, у перерахунку на суху речовину.

Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23, метод Л).

**Випробовуваний розчин.** 50.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25.0 мл. Якщо необхідно, доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до необхідної концентрації (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

**Розчини порівняння.** Свіжоприготовані розчини, що містять 0.40 мкг/мл Zn, 0.80 мкг/мл Zn, 1.00 мкг/мл Zn, 1.20 мкг/мл Zn, 1.60 мкг/мл Zn, готують відповідними розведеннями еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) Р 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої.

**Джерело випромінювання:** лампа із порожнистим цинковим катодом.

**Довжина хвилі:** 213.9 нм.

**Полум'я:** повітряно-ацетиленове підходячого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 0.200 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 24 год.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 2.5 %, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять із 0.200 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 10 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідина хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** 40.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** Вміст віали ФСЗ інсуліну людського розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (б).** Вміст віали ФСЗ інсуліну свинячого розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

**Розчин порівняння (с).** 1.0 мл розчину порівняння (б) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:** змішують 1.0 мл розчину порівняння (а) і 1.0 мл розчину порівняння (б).

Розчини зберігають при температурі (2-10) °С і використовують протягом 48 год. Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі (2-10) °С.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:** рухома фаза А — рухома фаза В (42:58), якщо необхідно, коригують склад суміші.

Наведені нижче розчини готують і зберігають при температурі не нижче 20 °С:

- **рухома фаза А:** 28.4 г натрію сульфату безводного Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл; додають 2.7 мл кислоти фосфорної Р; якщо необхідно, доводять до рН 2.3 етаноламіном Р; фільтрують і дегазують;
- **рухома фаза В:** змішують 550 мл рухомої фази А та 450 мл ацетонітрилу Р. Одержаний розчин нагрівають до температури не нижче 20 °С для запобігання утворенню осаду (змішування рухомої фази з ацетонітрилом є ендотермічним процесом); фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Придатність хроматографічної системи:**

- **коефіцієнт розділення:** хроматографують 20 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи та 20 мкл розчину порівняння (б). Час хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи має становити не менше часу, необхідного до повного виходу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (б). На хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи ідентифікують піки, відповідні інсуліну свинячому та інсуліну людському. Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо коефіцієнт розділення для пиків інсуліну людського та інсуліну свинячого становить не менше 1.2. Якщо необхідно, для досягнення належного розділення регулюють співвідношення рухомих фаз А і В;

— *лінійність*: хроматографують 20 мкл розчину порівняння (b) і 20 мкл розчину порівняння (c). Результати аналізу вважаються вирогідними, якщо площа основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) становить  $(10 \pm 0.5)$  площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c). Якщо ця умова не виконується, коригують об'єм інжекції в межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від ступеня лінійності сигналу детектора.

*Об'єм інжекції*: 20 мкл випробовуваного розчину.

Вміст інсуліну свинячого  $C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$  у сумі із А21 дезамідоінсуліном свинячим визначають, використовуючи площу основного піка і площу піка А21 дезамідоінсуліну свинячого на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння (b) та зазначений вміст інсуліну свинячого у сумі із А21 дезамідоінсуліном свинячим у *ФСЗ інсуліну свинячого*.

## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до використання у виробництві. Після розморожування інсулін зберігають при температурі  $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  і використовують у виробництві протягом короткого періоду часу. Для запобігання абсорбції вологи повітря при зважуванні інсулін перед відкриванням контейнера має бути витриманий при кімнатній температурі.

# ІНСУЛІНУ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

## Praeparationes insulini injectabiles

### INSULIN PREPARATIONS, INJECTABLE

*Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій мають витримувати вимоги до ін'єкційних засобів, зазначені у статті «Лікарські засоби для парентерального застосування».*

Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій є стерильними лікарськими засобами на основі субстанцій, описаних у статтях «Інсулін людський», «Інсулін бичачий» або «Інсулін свинячий». Вони містять не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від кількості інсуліну, зазначеного на етикетці. Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій є розчинами або суспензіями, або їх готують шляхом змішування розчинів і суспензій.

## ВИРОБНИЦТВО

Методи приготування розробляються для забезпечення необхідних властивостей препарату, що

пов'язані із гостротою захворювання та тривалістю терапевтичної дії препарату.

У залежності від методу приготування у підходячому порядку виконують такі операції:

- додавання відповідних антимікробних консервантів;
- додавання підхожої субстанції або субстанцій для забезпечення ізотонічності препарату по відношенню до крові;
- додавання підхожої субстанції або субстанцій для доведення рН до необхідного значення;
- визначення активності компонента або компонентів, що містять інсулін, із подальшим, якщо необхідно, регулюванням активності, щоб готові лікарські засоби містили необхідну кількість Міжнародних Одиниць у мілілітрі;
- стерилізація шляхом фільтрації компонента або компонентів, що містять інсулін; після проведення даної операції всі подальші операції мають виконуватися в асептичних умовах із використанням матеріалів, підданих стерилізації підходящим методом.

Крім того, якщо необхідно, для забезпечення необхідної фізичної форми компонента або компонентів, що містять інсулін, додають підхожі речовини та проводять підхожі операції. Готовий препарат розливають в асептичних умовах у стерильні контейнери, що укуповорені так, щоб виключити мікробне забруднення.

## ВИПРОБУВАННЯ

**рН (2.2.3).** Від 6.9 до 7.8, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

**Інсулін у надосадовій рідині.** Для лікарських засобів інсуліну для парентерального застосування, що є суспензіями, не більше 2.5 % від загального вмісту інсуліну, якщо немає інших зазначень.

10 мл суспензії центрифугують при 1500 g протягом 10 хв і обережно відокремлюють надосадову рідину від осаду. Визначають вміст інсуліну (S) у надосадовій рідині підходящим методом, наприклад, методом хроматографії, як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Вміст інсуліну у розчині, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{100 \times S}{T}$$

де:

T — загальний вміст інсуліну, визначений, як описано в розділі «Кількісне визначення».

**Домішки із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу інсуліну.** Ексклюзивна хроматографія (2.2.30).

**Випробовуваний розчин.** Для отримання прозорого кислого розчину інсуліну до 1 мл препарату, що є суспензією або розчином, додають 4 мкл 6 M розчину:

## Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій

кислоти хлористоводневої. Якщо зразок є суспензією, суспензію перемішують до отримання однорідного зразка. Якщо суспензія не стає прозорою протягом 5 хв після додавання кислоти хлористоводневої, додають невеликі аліквоти кислоти (менше 4 мкл/мл) до одержання розчину. Лікарські засоби із концентрацією інсуліну більше 100 МО/мл розводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої, щоб запобігти перевантаженню колонки мономером інсуліну.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Використовують розчин інсуліну (близько 4 мг/мл), що містить більше 0.4 % високомолекулярних білків. Можуть бути використані лікарські засоби інсуліну для ін'єкцій, такі як розчин або суспензія, освітлені певною кількістю 6 М розчину кислоти хлористоводневої, що містять визначений відсотковий вміст високомолекулярних білків, або розчин субстанції інсуліну в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Інсулін, що містить визначений відсотковий вміст високомолекулярних протеїнів, може бути приготований із субстанції інсуліну, витриманої при кімнатній температурі протягом близько 10 діб.

Розчини зберігають при температурі від 2 °С до 10 °С і використовують протягом 30 год (розчин інсуліну для ін'єкцій) або 7 діб (інші препарати інсуліну). Якщо використовують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі від 2 °С до 10 °С.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

**Колонка:**

— розмір: 0.3 м × 7.5 мм,

— нерухома фаза: силікагель гідрофільний для хроматографії Р (5-10 мкм), підхожий для розділення мономерів інсуліну від димерів і полімерів;

**Рухома фаза:** кислота оцтова льодяна Р - ацетонітрил Р - розчин 1.0 г/л аргініну Р (15:20:65). Одержану суміш фільтрують і дегазують.

**Швидкість рухомої фази:** 0.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 276 нм.

**Урівноваження колонки:** нову колонку перед використанням урівноважують шляхом повторного хроматографування розчину інсуліну, що містить високомолекулярні протеїни. Для цього розчин для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують не менше 3 разів. Колонка вважається врівноваженою, якщо для двох послідовних інжекцій одержано однакові результати. Якщо аналізують зразки, що містять протамін, урівноважують колонку із використанням розчину, що містить протамін.

Хроматографують 100 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. При хроматографуванні у зазначених умовах часи утримування мають становити: полімерних комплексів інсуліну

(13-17) хв, ковалентного димеру інсуліну близько 17.5 хв; мономеру інсуліну близько 20 хв, солей близько 22 хв. Якщо випробовуваний розчин містить консерванти, наприклад, метилпарагідроксibenзоат, *m*-крезол або фенол, ці компоненти елююються пізніше. Хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення  $H_p$  до  $H_s$  становить не менше 2.0, де  $H_p$  — висота піка димеру над базовою лінією,  $H_s$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком димеру та піком мономеру.

Хроматографують 100 мкл випробовуваного розчину. Час хроматографування має становити близько 35 хв. На хроматограмі випробовуваного розчину сума площ піків із часом утримування меншим, ніж час утримування основного піка має становити не більше 3.0 % (для лікарських засобів, що містять протамін) або 2.0 % (для лікарських засобів, що не містять протаміну) суми площ усіх піків. Не враховують піки із часом утримування більшим, ніж час утримування піка інсуліну.

**Супровідні білки.** Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Використовують таку програму:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітка
0 - 30	42	58	ізократичний режим
30 - 44	42 → 11	58 → 89	лінійний градієнт
44 - 50	11	89	ізократичний режим

Розчини витримують при температурі від 2 °С до 10 °С і використовують протягом 24 год. Придатність хроматографічної системи (коефіцієнт розділення, лінійність) перевіряють, як описано у випробуванні «Кількісне визначення». Якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз для забезпечення повного виходу А21 дезамідоінсуліну свинячого перед початком градієнта. Профіль градієнта може бути відкорегований для забезпечення повного виходу всіх супровідних домішок інсуліну.

Хроматографують 20 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння (а) для інсуліну лікарських засобів із активністю 100 МО/мл або розчину порівняння (б) для інсуліну лікарських засобів із активністю 40 МО/мл. Якщо необхідно, коригують об'єм інжекції у межах від 10 мкл і 20 мкл залежно від виконання вимог із лінійності, як описано в розділі «Кількісне визначення». Хроматографують протягом близько 50 хв. Якщо необхідно, змінюють склад рухомої фази, щоб антимікробні консерванти у випробовуваному розчині краще розділилися з інсуліном і виходили з меншим часом утримування. Невелике зменшення концентрації ацетонітрилу збільшує час утримування піків інсуліну сильніше, ніж піків консервантів.

На хроматограмі розчину порівняння (а) або розчину порівняння (б) А21 дезамідоінсулін виявляється як невеликий пік після основного піка і має відносний час утримування по відношенню до основного піка близько 1.3.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка А21 дезамідоінсуліну не має перевищувати 5.0 % суми площ усіх піків; сума площ усіх піків, крім піків інсуліну та А21 дезамідоінсуліну, не має перевищувати 6.0 % суми площ усіх піків. Не враховують піки консервантів і протаміну (єлюються першими).

**Загальний цинк.** Не більше, ніж зазначено в окремій статті. Випробування проводять методом атомно-абсорбційної спектрометрії (2.2.23, метод І).

*Використовують наведену нижче методику, якщо немає інших зазначень в окремій статті.*

*Випробовуваний розчин.* Препарат обережно струшують, відбирають об'єм препарату, що містить 200 МО інсуліну і доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до 25.0 мл. Якщо необхідно, доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до необхідної концентрації цинку (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

*Розчини порівняння.* Свіжоприготовані розчини, що містять 0.40 мкг/мл Zn, 0.80 мкг/мл Zn, 1.00 мкг/мл Zn, 1.20 мкг/мл Zn, 1.60 мкг/мл Zn, готують відповідними розведеннями еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) Р 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої.

Вимірюють поглинання випробовуваного розчину і розчинів порівняння за довжини хвилі 213.9 нм, використовуючи як джерело випромінювання лампу із порожнистим цинковим катодом і повітряно-ацетиленове полум'я підхожого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Цинк у розчині.** Де застосовно, не більше, ніж зазначено в окремій статті. Випробування проводять методом атомно-абсорбційної спектрометрії (2.2.23, метод І).

*Випробовуваний розчин.* Препарат центрифугують і 1 мл прозорої надосадової рідини доводять водою Р до об'єму 25.0 мл. Якщо необхідно, розводять розчин водою Р до підхожого концентрації цинку (наприклад, від 0.4 мкг/мл Zn до 1.6 мкг/мл Zn).

*Розчини порівняння.* Свіжоприготовані розчини, що містять 0.40 мкг/мл Zn, 0.80 мкг/мл Zn, 1.00 мкг/мл Zn, 1.20 мкг/мл Zn, 1.60 мкг/мл Zn, готують відповідними розведеннями еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn) Р 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої.

Вимірюють поглинання випробовуваного розчину і розчинів порівняння за довжини хвилі 213.9 нм, використовуючи як джерело випромінювання лампу із порожнистим цинковим катодом і повітряно-

ацетиленове полум'я підхожого складу (наприклад, 11 літрів повітря та 2 літри ацетилену за хвилину).

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 80 МО у 100 МО інсуліну.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Для отримання прозорого розчину до 1 мл препарату, що є суспензією або розчином, додають 4 мкл 6 М розчину кислоти хлористоводневої. Якщо зразок є суспензією, суспензію перемішують до отримання однорідного зразка. Якщо суспензія не стає прозорою протягом 5 хв після додавання кислоти хлористоводневої, додають невеликі аліквоти кислоти (менше 4 мкл/мл) до одержання розчину. Лікарські засоби із концентрацією інсуліну більше 100 МО/мл розводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої, щоб запобігти перевантаженню колонки.

*Розчин порівняння (а).* Для лікарських засобів, що містять інсулін одного виду, розчиняють, відповідно, вміст віали ФСЗ інсуліну людського, ФСЗ інсуліну свинячого або ФСЗ інсуліну бичачого у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до отримання розчину із концентрацією 4.0 мг/мл. Для препаратів, що містять і бичачий, і свинячий інсуліни, до 1.0 мл розчину 4.0 мг/мл ФСЗ інсуліну бичачого у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої додають 1.0 мл розчину 4.0 мг/мл ФСЗ інсуліну свинячого в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Розчин порівняння (а) використовують для кількісного визначення в лікарських засобах інсуліну, що містять 100 МО/мл.

*Розчин порівняння (б).* 4.0 мл розчину порівняння (а) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл. Розчин порівняння (б) використовують для кількісного визначення в лікарських засобах інсуліну, що містять 40 МО/мл.

*Розчин порівняння (с).* Вміст віали ФСЗ інсуліну людського розчиняють в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

*Розчин порівняння (д).* Вміст віали ФСЗ інсуліну свинячого розчиняють в 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації 4.0 мг/мл.

*Розчин порівняння (е).* 1.0 мл розчину порівняння (а) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (ф).* 1.0 мл розчину порівняння (б) доводять 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 10.0 мл.

*Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.* Змішують 1.0 мл розчину порівняння (с) і 1.0 мл розчину порівняння (д).

Розчини зберігають при температурі від 2 °С до 10 °С і використовують протягом 48 год. Якщо використо-

## Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій

вують автоматичний інжектор, розчини зберігають при температурі від 2 °С до 10 °С.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.25 м × 4.6 мм, заповнена *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р* із розміром частинок 5 мкм;
- як рухома фаза використовують наведені нижче розчини, що готують і витримують при температурі не нижче 20 °С:  
*Рухома фаза А:* 28.4 г *натрію сульфату безводного Р* розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл; додають 2.7 мл *кислоти фосфорної Р*; якщо необхідно, доводять до рН 2.3 *етаноламіном Р*; фільтрують і дегазують;
- Рухома фаза В:* змішують 550 мл рухомої фази А та 450 мл *ацетонітрилу Р*. Одержаний розчин нагрівають до температури не нижче 20 °С для запобігання утворення осаду (змішування рухомої фази з ацетонітрилом є ендотермічним процесом); фільтрують і дегазують;
- швидкість рухомої фази: 1 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 214 нм;
- температура колонки 40 °С.

Елюють суміш рухома фаза А - рухома фаза В (42:58), якщо необхідно, коригують склад суміші.

Хроматографують 20 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи та 20 мкл розчину порівняння (d). Час хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи має становити не менше часу, необхідного до повного виходу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d). На хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи ідентифікують піки, відповідні інсуліну свинячому та інсуліну людському. Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо коефіцієнт розділення для піків інсуліну людського та інсуліну свинячого становить не менше 1.2. Якщо необхідно, для досягнення належного розділення регулюють співвідношення рухомих фаз.

Хроматографують 20 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння (a) і 20 мкл розчину порівняння (e) для лікарських засобів інсуліну, що містять 100 МО/мл або 20 мкл розчину порівняння (b) і 20 мкл розчину порівняння (f) для лікарських засобів інсуліну, що містять 40 МО/мл. Якщо необхідно, змінюють склад рухомої фази, щоб антимікробні консерванти у випробовуваному розчині краще розділилися з інсуліном і виходили з меншим часом утримування. Невелике зменшення концентрації ацетонітрилу збільшує час утримування піків інсуліну сильніше, ніж піків консервантів. Якщо необхідно, після хроматографування розчину перед хроматографуванням наступного розчину промивають колонку сумішшю рівних об'ємів *ацетонітрилу Р* і *води Р* протягом часу, достатнього для виходу будь-якої речовини, що перешкоджає.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо площа основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) або розчину порівняння (b) становить  $(10 \pm 0.5)$  площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (e) або розчину порівняння (f). Якщо ця умова не виконується, коригують об'єм інжекції в межах від 10 мкл до 20 мкл залежно від ступеня лінійності сигналу детектора.

Вміст інсуліну у сумі із А21 дезамідоінсуліном визначають, використовуючи площі піків інсуліну бичачого, інсуліну свинячого або інсуліну людського та площ піків А21 дезамідоінсуліну та зазначений вміст інсуліну у сумі із А21 дезамідоінсуліном у *ФСЗ інсуліну бичачого*, *ФСЗ інсуліну свинячого* або *ФСЗ інсуліну людського*, відповідно.

Для препаратів, що містять і бичачий, і свинячий інсулін, підсумовують площі піків бичачого і свинячого інсулінів і площі піків відповідних похідних А21 дезамідоінсулінів<sup>(1)</sup>.

### ЗБЕРІГАННЯ

Якщо немає інших зазначень, зберігають у стерильному, повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття, у захищеному від світла місці при температурі від 2 °С до 8 °С. Не допускається заморожування лікарських засобів інсуліну.

### МАРКУВАННЯ

Зазначають:

- активність у МО/мл;
- концентрацію у міліграмах інсуліну в мілілітрі (для препаратів, що містять і бичачий, і свинячий інсуліни, концентрацію зазначають як сумарний вміст обох інсулінів);
- якщо необхідно, що субстанція одержана методом ферментативної модифікації свинячого інсуліну;
- якщо необхідно, що субстанція одержана за допомогою технології рекомбінантної ДНК;
- якщо необхідно, вид тварини, із якої отриманий інсулін;
- застереження щодо неприпустимості заморожування;
- якщо необхідно, що лікарський засіб перед використанням має бути ресуспендований.

(1) 100 МО відповідає 3.47 мг інсуліну людського, 3.45 мг інсуліну свинячого та 3.42 мг інсуліну бичачого.

## ІНСУЛІНУ ЦИНКОВА СУСПЕНЗІЯ (АМОРФНА) ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Insulini zinci amorphi suspensio  
iniectabilis

### INSULIN ZINC INJECTABLE SUSPENSION (AMORPHOUS)

*Інсуліну цинкова суспензія (аморфна) для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій» із урахуванням додаткових вимог, зазначених нижче.*

Інсуліну цинкова суспензія (аморфна) для ін'єкцій є стерильною нейтральною суспензією інсуліну бичачого, інсуліну свинячого або інсуліну людського із підхожою сіллю цинку; інсулін міститься у формі, практично не розчинній у воді.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Суспензія білого або майже білого кольору, при відстоюванні якої утворюється білий або майже білий осад і безбарвна або майже безбарвна надосадова рідина; осад легко ресуспендується при обережному струшуванні. Під мікроскопом частинки мають різну форму та максимальний розмір зрідка більше 2 мкм.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

На хроматограмі випробовуваного розчину пік інсуліну має відповідати основному піку на хроматограмі відповідного розчину порівняння.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Загальний цинк.** Від 0.12 мг/100 МО інсуліну до 0.25 мг/100 МО інсуліну. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

**Цинк у розчині.** Від 20 % до 65 % від загального вмісту цинку має бути у вигляді цинку у розчині. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

## ІНСУЛІНУ ЦИНКОВА СУСПЕНЗІЯ (КРИСТАЛІЧНА) ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Insulini zinci cristallini suspensio  
iniectabilis

### INSULIN ZINC INJECTABLE SUSPENSION (CRYSTALLINE)

*Інсуліну цинкова суспензія (кристалічна) для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій» із урахуванням додаткових вимог, зазначених нижче.*

Інсуліну цинкова суспензія (кристалічна) для ін'єкцій є стерильною нейтральною суспензією інсуліну бичачого, інсуліну свинячого або інсуліну людського із підхожою сіллю цинку; інсулін міститься у формі, практично не розчинній у воді.

#### ВЛАСТИВОСТІ

Суспензія білого або майже білого кольору, при відстоюванні якої утворюється білий або майже білий осад і безбарвна або майже безбарвна надосадова рідина; осад легко ресуспендується при обережному струшуванні. Під мікроскопом частинки виглядають як ромбоєдричні кристали, більшість із яких мають розмір від кута до кута через кристал більше 10 мкм, але зрідка перевищують 40 мкм.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

На хроматограмі випробовуваного розчину пік інсуліну має відповідати основному піку на хроматограмі відповідного розчину порівняння.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Інсулін, що не витягається забуференим ацетоновим розчином.** Не менше 90 % від сумарного вмісту інсуліну. Об'єм субстанції, що містить 200 МО інсуліну, центрифугують, надосадову рідину відкидають. Одержаний залишок суспендують у 1.65 мл води *R*, додають 3.3 мл забуференого ацетонового розчину *R*, струшують протягом 3 хв, знову центрифугують, надосадову рідину відкидають та повторюють усі операції із залишком. Залишок розчиняють, використовуючи підхожу методику, наприклад, розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої до кінцевого об'єму 2.0 мл. Визначають вміст інсуліну у залишку (*R*) та сумарний вміст інсуліну (*T*) в однаковому об'єму суспензії підхожим методом.



## Інсуліну цинкова суспензія для ін'єкцій

Вміст інсуліну, що не витягається забуференим ацетоновим розчином, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{100 \times R}{T}$$

**Загальний цинк.** Від 0.12 мг/100 МО інсуліну до 0.25 мг/100 МО інсуліну. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

**Цинк у розчині.** Від 20 % до 65 % від загального вмісту цинку має бути у вигляді цинку у розчині. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

## ІНСУЛІНУ ЦИНКОВА СУСПЕНЗІЯ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Insulini zinci suspensio iniectionis

#### INSULIN ZINC INJECTABLE SUSPENSION

Інсуліну цинкова суспензія для ін'єкцій має відповідати вимогам статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій» із урахуванням додаткових вимог, зазначених нижче.

Інсуліну цинкова суспензія для ін'єкцій є стерильною нейтральною суспензією інсуліну бичачого і/або інсуліну свинячого або інсуліну людського із підмогою сіллю цинку; інсулін міститься у формі, практично не розчинній у воді.

#### ВИРОБНИЦТВО

Інсуліну цинкову суспензію для ін'єкцій готують, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

Інсуліну цинкову суспензію для ін'єкцій одержують змішуванням інсуліну цинкової суспензії (кристалічної) для ін'єкцій та інсуліну цинкової суспензії (аморфної) для ін'єкцій у відношенні (7:3).

#### ВЛАСТИВОСТІ

Суспензія білого або майже білого кольору, при відстоюванні якої утворюється білий або майже білий осад і безбарвна або майже безбарвна надосадова рідина; осад легко ресуспендується при обережному струшуванні. Під мікроскопом частинки виглядають як ромбосдричні кристали, більшість із яких

мають розмір від кута до кута через кристал більше 10 мкм, але зрідка перевищують 40 мкм. Значна частка частинок має різну форму та максимальний розмір зрідка більше 2 мкм.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Переглядають хроматограму, одержану у випробуванні «Кількісне визначення».

Для препаратів, одержаних із інсуліну одного виду (бичачого, свинячого або людського), на хроматограмі випробовуваного розчину пік інсуліну має відповідати основному піку на хроматограмі відповідного розчину порівняння. Для препаратів, одержаних із суміші інсуліну бичачого та інсуліну свинячого, на хроматограмі випробовуваного розчину піки двох інсулінів мають відповідати основним пікам на хроматограмі відповідного розчину порівняння.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Інсулін, що не витягається забуференим ацетоновим розчином.** Від 63 % до 77 % від сумарного вмісту інсуліну. Об'єм субстанції, що містить 200 МО інсуліну, центрифугують, надосадову рідину відкидають. Одержаний залишок суспендують у 1.65 мл води *P*, додають 3.3 мл забуференого ацетонового розчину *P*, струшують протягом 3 хв, знову центрифугують, надосадову рідину відкидають і повторюють усі операції із залишком. Залишок розчиняють, використовуючи підхожу методику, наприклад, розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої до кінцевого об'єму 2.0 мл. Визначають вміст інсуліну у залишку (*R*) та сумарний вміст інсуліну (*T*) в однаковому об'ємі суспензії підхожим методом.

Вміст інсуліну, що не витягається забуференим ацетоновим розчином, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{100 \times R}{T}$$

**Загальний цинк.** Від 0.12 мг/100 МО інсуліну до 0.25 мг/100 МО інсуліну. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

**Цинк у розчині.** Від 20 % до 65 % від загального вмісту цинку має бути у вигляді цинку у розчині. Визначення проводять, як описано у статті «Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій».

# ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2 РОЗЧИН КОНЦЕНТРОВАНИЙ

## Interferoni alfa-2 solutio concentrata

### INTERFERON ALFA-2 CONCENTRATED SOLUTION

CDLPQTHSLG SRRTLMLLAQ MRX<sub>1</sub>ISLFSCL KDRHDFGFPO  
EEFGNQFQKA<sub>1</sub>ETIPVLHEMI<sub>1</sub>QQIFNLFSTK DSSAAWDETL  
LDKFYTELYQ QLNLEACVI<sub>1</sub>QGVGVTEPL MKEDSILAVR  
KYFQRITLYL KEKKYSPCAW EVVRAEIMRS FSLSTNLQES  
LRSKE

Інтерферону альфа-2 розчин концентрований є розчином білка, що одержують на основі гена, що несе інформацію про підвид альфа-2 інтерферону альфа, та що виявляє неспецифічну антивірусну активність, принаймні у гомологічних клітинах, обумовлену дією на клітинний метаболізм, що включає синтез як рибонуклеїнової кислоти, так і білка. Інтерферону альфа-2 розчин концентрований виявляє також антипроліферативну активність. Різні типи альфа-2 інтерферону, що відрізняються амінокислотним залишком у положенні 23, позначають малими буквами.

Назва	Амінокислотний залишок у положенні 23 (X <sub>1</sub> )
альфа-2a	Lys
альфа-2b	Arg

Ця монографія застосовна для інтерферону альфа-2a та -2b концентрованих розчинів.

Активність інтерферону альфа-2 концентрованого розчину не менше  $1.4 \times 10^8$  МО/мг білка. Інтерферону альфа-2 концентрований розчин містить не менше  $2 \times 10^8$  МО інтерферону альфа-2 у мілілітрі.

### ВИРОБНИЦТВО

Інтерферону альфа-2 концентрований розчин одержують за допомогою технології рекомбінантної ДНК (р-ДНК), використовуючи як клітини-хазяїни бактерії. Інтерферону альфа-2 концентрований розчин одержують в умовах, що мінімізують мікробіологічне забруднення.

Інтерферону альфа-2 концентрований розчин має витримувати наведені нижче додаткові випробування.

**Залишкові білки клітини-хазяїна.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Залишкова ДНК клітини-хазяїна або вектора.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

### ВЛАСТИВОСТІ

Прозора безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Інтерферону альфа-2 концентрований розчин має відповідати вимогам щодо передбачуваної біологічної активності, зазначеним у розділі «Кількісне визначення».

**B.** Випробування проводять методом ізоелектричного фокусування.

*Випробовуваний розчин.* Випробовуваний препарат розводять водою *P* до концентрації білка 1 мг/мл.

*Розчин порівняння.* Готують розчин 1 мг/мл відповідним розведенням *ФСЗ* інтерферону альфа-2 у воді *P*.

*Розчин для калібрування ізоелектричної точки у діапазоні рН від 3.0 до 10.0.* Розчин готують і використовують відповідно до інструкції виробника.

Використовують підходящий прилад, приєднаний до рециркуляційної водяної бані, термостатованої на 10 °С, і гелі для ізоелектричного фокусування із градієнтом рН від 3.5 до 9.5. Прилад використовують відповідно до інструкції виробника. Як анодний розчин використовують розчин кислоти фосфорної *P* (98 г/л  $H_3PO_4$ ), як катодний розчин — 1 М розчин натрію гідроксиду. Зразки наносять на гель за допомогою паперових фільтрів. Фільтри із нанесеним на гель зразком поміщають поблизу катода.

Наносять 15 мкл випробовуваного розчину та 15 мкл розчину порівняння. Починають ізоелектричне фокусування при напрузі 1500 В і силі струму 50 мА. Через 30 хв вимикають напругу, видаляють фільтри та повторно вмикають напругу на 1 год. Протягом випробування витримують постійними напругу та силу струму. Після фокусування занурюють гель у підходящий об'єм розчину, що містить 115 г/л кислоти трихлороцтової *P* і 34.5 г/л кислоти сульфосаліцилової *P* у воді *P*, і обережно струшують контейнер протягом 60 хв. Переносять гель у суміш кислота оцтова льодяна *P* - етанол *P* - вода *P* (32:100:268) і витримують протягом 5 хв. Гель занурюють у попередньо підігрітий до температури 60 °С забарвлювальний розчин, приготований додаванням розчину 1.2 г/л кислотного синього 83 *P* до вищезазначеної суміші кислоти оцтової льодяної, етанолу та води і витримують протягом 10 хв. Гель промивають у кількох контейнерах приготованою як зазначено вище сумішшю кислоти оцтової льодяної, етанолу та води та витримують гель у зазначеній суміші до знебарвлення фону (від 12 год до 24 год). Після знебарвлення гель занурюють у розчин 10 % (об/об) гліцерину *P* у приготіваній як зазначено вище суміші кислоти оцтової льодяної, етанолу та води на 1 год.

## Інтерферону альфа-2 розчин концентрований

На електрофореграмі випробовуваного розчину мають виявлятися основні смуги на рівні основних смуг на електрофореграмі розчину порівняння. Будують графік у системі: відстані міграції ізоелектричної точки маркерів - ізоелектричні точки та визначають ізоелектричні точки основних компонентів випробовуваного розчину та розчину порівняння. Вони не мають відрізнятись більше ніж на 0.2 одиниці рІ.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо ізоелектричні точки маркерів розподілені по всій довжині гелю та ізоелектричні точки основних смуг на електрофореграмі розчину порівняння знаходяться між 5.8 і 6.3.

**С.** Переглядають електрофореграму, одержану в умовах випробування на домішки із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси інтерферону альфа-2. На електрофореграмі випробовуваного розчину (а) має виявлятися основна смуга на рівні основної смуги на електрофореграмі розчину порівняння (а).

**Д.** Випробування проводять методом пептидного картування.

*Випробовуваний розчин.* Випробовуваний препарат розводять водою Р до концентрації білка 1.5 мг/мл. 25 мкл одержаного розчину переносять у поліпропіленову або скляну пробірку місткістю 1.5 мл, додають 1.6 мкл 1 М фосфатного буферного розчину рН 8.0 Р, 2.8 мкл свіжоприготованого розчину 1.0 мг/мл трипсину для пептидного картування Р у воді Р, 3.6 мкл води Р та енергійно струшують. Закривають пробірку, витримують її у водяній бані при температурі 37 °С протягом 18 год, додають 100 мкл розчину 573 г/л гуанідину гідрохлориду Р і ретельно перемішують. До одержаного розчину додають 7 мкл розчину 154.2 г/л дитіотреїтолу Р, ретельно перемішують, закрити пробірку витримують у киплячій воді протягом 1 хв і охолоджують до кімнатної температури.

*Розчин порівняння.* Готують паралельно із випробовуваним розчином із використанням розчину 1.5 мг/мл відповідного ФСЗ інтерферону альфа-2 у воді Р.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

— колонка із нержавіючої сталі розміром 0.10 м × 4.6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р (5 мкм) із розміром пор 30 нм;

— швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв:

*Рухома фаза А.* 1 мл кислоти трифтороцтової Р доводять водою Р до об'єму 1000 мл,;

*Рухома фаза В.* До 100 мл води Р додають 1 мл кислоти трифтороцтової Р і доводять об'єм розчину ацетонітрилом для хроматографії Р до об'єму 1000 мл;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітки
0 - 8	100	0	ізократичний режим
8 - 68	100 → 40	0 → 60	лінійний градієнт
68 - 72	40	60	ізократичний режим
72 - 75	40 → 100	60 → 0	лінійний градієнт
75 - 80	100	0	повторне урівноваження

— детектування за довжини хвилі 214 нм;

— температура колонки 30 °С.

Урівноважують колонку рухомою фазою А протягом не менше 15 хв.

Хроматографують 100 мкл випробовуваного розчину та 100 мкл розчину порівняння. Хроматографічна система вважається придатною, якщо хроматограма кожного розчину якісно співставна із хроматограмою інтерферону альфа-2, що надається до відповідного ФСЗ інтерферону альфа-2.

Хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Домішки із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси інтерферону альфа-2.* Випробування проводять методом електрофорезу з натрію додецилсульфатом у поліакриламідному гелі (ДСН-ПАГ) (2.2.31). Випробування проводять як у відновлювальних, так і у не відновлювальних умовах, використовуючи 14 % акриламідні розділювальні гелі та забарвлювання сріблом як метод виявлення.

*Буферний розчин для зразків (не відновлювальні умови).* Змішують рівні об'єми води Р та ДСН-ПАГ буферного розчину для зразків концентрованого Р.

*Буферний розчин для зразків (відновлювальні умови).* Змішують рівні об'єми води Р та ДСН-ПАГ буферного розчину для зразків концентрованого (відновлювальні умови) Р, що містить 2-меркаптоетанол як відновлювальну речовину.

*Випробовуваний розчин (а).* Випробовуваний препарат розводять буферним розчином для зразків до концентрації білка 0.5 мг/мл.

*Випробовуваний розчин (б).* 0.20 мл випробовуваного розчину (а) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (а).* Готують розчин 0.625 мг/мл відповідного ФСЗ інтерферону альфа-2 у буферному розчині для зразків.

*Розчин порівняння (б).* 0.20 мл розчину порівняння (а) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (с).* 0.20 мл розчину порівняння (б) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (d).* 0.20 мл розчину порівняння (c) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (e).* 0.20 мл розчину порівняння (d) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (f).* Використовують розчин зі стандартами молекулярних мас для калібрування ДСН-ПАГ гелів в межах від 15 кДа до 67 кДа.

Випробовувані розчини та розчини порівняння поміщають у пробірки, закривають пробірки та витримують на водяній бані протягом 2 хв.

У кишеньки концентруючого гелю вносять 10 мкл розчину порівняння (f) і по 50 мкл кожного іншого розчину. Проводять електрофорез в умовах, зазначених в інструкції для приладу. Виявляють білки у гелі методом забарвлювання сріблом.

Результати випробування вважаються вірогідними, якщо валідаційні характеристики відповідають вимогам статті (2.2.3Л); на електрофореграмі розчину порівняння (e) виявляється смуга; інтенсивність забарвлення на електрофореграмах змінюється у такому порядку: випробовуваний розчин (a), випробовуваний розчин (b), для розчинів порівняння — від (a) до (e).

На електрофореграмі випробовуваного розчину (a) за зазначених умов можуть виявлятися, крім основної смуги, менш інтенсивні смуги білків із молекулярною масою, меншою за молекулярну масу білків на основній смузі. На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (d) (1.0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (e) (0.2 %).

На електрофореграмі випробовуваного розчину (a), одержаної у не відновлювальних умовах, можуть виявлятися, крім основної смуги, менш інтенсивні смуги білків із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу білків на основній смузі. На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (d) (1.0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (e) (0.2 %).

**Супровідні білки.** Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Випробовуваний препарат розводять водою Р до одержання розчину із концентрацією білка 1 мг/мл.

*Розчин 0.25 % (м/м) водню пероксиду.* Водню пероксиду розчин розведений Р розводять водою Р до одержання розчину 0.25 % (м/м).

*Розчин порівняння.* До випробовуваного розчину додають підхожий об'єм розчину 0.25 % (м/м) водню

пероксиду до одержання розчину із концентрацією водню пероксиду 0.005 % (м/м), витримують при кімнатній температурі протягом 1 год або протягом довшого часу до одержання близько 5 % окисненого інтерферону. Додають на 1 мл розчину 12.5 мг L-метіоніну Р. Одержаний розчин витримують при кімнатній температурі протягом 1 год. Розчини зберігають при температурі від 2 °С до 8 °С протягом не більше 24 год.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

— колонка із нержавіючої сталі розміром 0.25 м × 4.6 мм, заповнена *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р* (5 мкм) із розміром пор 30 нм;

— швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв:

*Рухома фаза А.* До 700 мл води Р додають 2 мл кислоти трифтороцтової Р і 300 мл ацетонітрилу для хроматографії Р;

*Рухома фаза В.* До 200 мл води Р додають 2 мл кислоти трифтороцтової Р і 800 мл ацетонітрилу для хроматографії Р;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітки
0 - 1	72	28	ізократичний режим
1 - 5	72 → 67	28 → 33	лінійний градієнт
5 - 20	67 → 63	33 → 37	лінійний градієнт
20 - 30	63 → 57	37 → 43	лінійний градієнт
30 - 40	57 → 40	43 → 60	лінійний градієнт
40 - 42	40	60	ізократичний режим
42 - 50	40 → 72	60 → 28	лінійний градієнт
50 - 60	72	28	повторне урівноваження колонки

— детектування за довжини хвилі 210 нм.

Урівноважують колонку рухомою фазою у співвідношенні рухомих фаз вихідного градієнта протягом не менше 15 хв.

Хроматографують по 50 мкл кожного розчину.

На одержаних хроматограмах інтерферон альфа-2 елюється із часом утримування близько 20 хв. На хроматограмі розчину порівняння відносний час утримування піка окисненого інтерферону має становити близько 0.9 по відношенню до основного піка. Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення між піками окисненого інтерферону та інтерферону становить не менше 1.0. Враховують лише піки із відносним часом утримування до основного піка від 0.7 до 1.4. На хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати 3.0 % суми площ усіх піків. Сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 5.0 % суми площ усіх піків.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 100 МО в об'ємі, що містить 1.0 мг білка.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ****Білок**

*Випробовуваний розчин.* Випробовуваний препарат розводять водою Р до одержання розчину із концентрацією інтерферону альфа-2 0.5 мг/мл.

*Розчини порівняння.* Готують вихідний розчин 0.5 мг/мл альбуміну бичачого Р. Готують 8 розведень вихідного розчину, що містять від 3 мкг/мл до 30 мкг/мл альбуміну бичачого Р.

Готують 30-кратне та 50-кратне розведення випробовуваного розчину. Додають 1.25 мл суміші, приготованої у той самий день додаванням 2.0 мл розчину 20 г/л міді сульфату Р у воді Р, 2.0 мл розчину 40 г/л натрію тартрату Р у воді Р і 96.0 мл розчину 40 г/л натрію карбонату Р у 0.2 М розчині натрію гідроксиду у пробірці, що містять 1.5 мл води Р (холостий розчин). 1.5 мл різних розведень випробовуваного розчину або 1.5 мл розчинів порівняння. Перемішують вміст пробірок після кожного додавання. Через близько 10 хв додають у кожен пробірочку 0.25 мл суміші рівних об'ємів води Р та фосфоромолібденового реактиву Р. Перемішують після кожного додавання. Через близько 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) кожного розчину за довжини хвилі 750 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційну рідину. Будують калібрувальний графік залежності оптичної густини кожного із 8 розчинів порівняння від вмісту білка. За калібрувальним графіком визначають вміст білка у випробовуваному розчині.

**Активність**

Активність інтерферону альфа-2 оцінюють, порівнюючи його захисну дію на клітини проти вірусної цитопатичної дії із дією відповідного міжнародного стандартного зразка рекомбінантного інтерферону альфа-2 людини або стандартного препарату, каліброваного у Міжнародних Одиницях.

1 Міжнародна Одиниця відповідає активності визначеної кількості певного міжнародного стандартного зразка. Еквівалентність Міжнародних Одиниць міжнародного стандартного зразка визначається Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я.

Кількісне визначення проводять підходящим методом, що базується на таких засадах.

У стандартних культуральних умовах використовують встановлену клітинну лінію, чутливу до дії підходящого цитопатичного вірусу (підходящою є диплоїдна фібробластна клітинна лінія людини, вільна від мікробного забруднення, сприйнятлива до інтерферону та чутлива до вірусу енцефаломіокардиту).

Можуть бути підходящими такі клітинні культури та віруси: MDBK клітини (ATCC № CCL22) або L клітини мишей (NCTC клон 929; ATCC № CCL 1) як клітинна культура та вірус везикулярного стоматиту VSV, штам Індіана (ATCC № VR-158) як інфекцій-

ний агент; або А-549 клітини (ATCC № CCL-185), сприйнятливі до інтерферону, як клітинна культура, та вірус енцефаломіокардиту (ATCC № VR-129В) як інфекційний агент.

У планшетах для мікротитрування інкубують не менше 4 серій клітин у 3 або більше різних розведеннях випробовуваного препарату та стандартного препарату, включаючи до кожної серії як відповідний контроль необроблені клітини. Вибирають концентрації препаратів так, щоб препарати у найменшій концентрації виявляли незначну захисну дію, а препарати у найбільшій концентрації виявляли захисну дію меншу, ніж їх максимальна захисна дія проти дії цитопатичного вірусу. У підходящий час додають цитопатичний вірус до всіх чарунок, за винятком чарунок із необробленими клітинами. Цитопатичний ефект вірусу визначають кількісно підходящим методом. Обчислюють активність випробовуваного препарату, використовуючи звичайні методи моделі паралельних ліній статистичного аналізу кількісного визначення.

Встановлена активність має бути не менше 80 % і не більше 125 % заявленої активності. Довірчий інтервал ( $P = 0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 64 % і не більше 156 % заявленої активності.

**ЗБЕРІГАННЯ**

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  або нижчій.

**МАРКУВАННЯ**

Зазначають:

- тип інтерферону (альфа-2а або альфа-2b),
- метод виробництва.

## ІНТЕРФЕРОНУ БЕТА-1а РОЗЧИН КОНЦЕНТРОВАНИЙ

Interferoni beta-1a solutio concentrata

### INTERFERON BETA-1a CONCENTRATED SOLUTION

MSYNLLGFLQ RSSNFQCQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI  
PEEIKQLQQF QKEDAALTY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN  
ETIVENLLAN VYHQENHLKT VLEEKLEKED FTRGKLMSSL  
HLKRYYGRIH HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI LRFNYFINRL  
TGYLRN

\* місце глікозилювання

$C_{908}H_{1406}N_{246}O_{252}S_7$

М.м. близько 22500

Розчин глікозилюваного білка, що має таку саму амінокислотну послідовність та дисульфідний зв'язок і таку саму модель глікозилювання, що й інтерферон бета, продукований диплоїдними фібробластами людини у відповідь на вірусні інфекції та різні інші збудники. Препарат виявляє антивірусну, антипроліферативну та імуномодельовальну дію.

**Вміст:** не менше 0.20 мг білка у мілілітрі.

**Активність:** не менше  $1.5 \times 10^8$  МО/мг білка.

Препарат може містити буферні солі.

### ВИРОБНИЦТВО

Інтерферону бета-1а концентрований розчин одержують за допомогою технології рекомбінантної ДНК (р-ДНК), використовуючи культуру клітин ссавців.

Кожна серія кінцевого нерозфасованого продукту перед випуском має витримувати наведені нижче випробування, за винятком тих випадків, коли це дозволено компетентним уповноваженим органом.

**Залишкові білки клітини-хазяїна.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Залишкова ДНК клітини-хазяїна або вектора.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**N-кінцеві укорочені форми.** Випробування на специфічні N-кінцеві укорочені форми проводять із використанням підходящих методів, наприклад визначення послідовності N-кінця. Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Димер і супровідні речовини із більшою молекулярною масою.** Вміст має бути не більшим, ніж встановлено компетентним уповноваженим органом. Визначен-

ня проводять методом рідинної хроматографії із використанням підходящої валідованої методики.

### ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Прозора або злегка опалесцююча безбарвна або світло-жовтавого кольору рідина.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Інтерферону бета-1а концентрований розчин має відповідати вимогам щодо передбачуваної біологічної активності, зазначеним у розділі «Кількісне визначення».

**B.** Розподіл ізоформ. Мас-спектрометрія (2.2.43).

**Введення зразка:** пряме введення знесоленого випробовуваного препарату або комбінація рідинна хроматографія/мас-спектрометрія.

**Спосіб іонізації:** електророзпилення.

**Запис сигналу:** реєструють повний сигнал у межах діапазону масових чисел від 1100 до 2400.

**Калібрування:** використовують міоглобін із співвідношенням  $m/z$  у діапазоні від 600 до 2400. Установлюють прилад у межах валідованих параметрів і аналізують зразок; відхилення не має перевищувати 0.02 % від заявленої маси.

**Інтерпретація результатів:** типовий спектр показує вміст 6 основних глікоформ (від А до F), що відрізняються ступінню сіалювання і/або антенним типом, як зазначено в Таблиці 1639.-1.

Таблиця 1639-1.

МС-пік	Глікоформа*	Передбачувана М.м.	Ступінь сіалювання
A	2A2S1F	22375	дисіальований
B	2A1S1F	22084	моносіальований
C	3A2S1F і/або 2A2S1F + 1 HexNacHex повтор	22739	дисіальований
D	3A3S1F	23031	трисіальований
E	4A3S1F і/або 3A3S1F + 1 HexNacHex повтор	23400	трисіальований
F	2A0S1F	21793	несіальований

\* 2A — олігосахариди із комплексом біантенного типу; 3A — олігосахариди із комплексом триантенного типу; 4A — олігосахариди із комплексом тетраантенного типу; 0S — несіальований; 1S — моносіальований; 2S — дисіальований; 3S — трисіальований; 1F — фукосіальований.

**Результати:** на мас-спектрі випробовуваного препарату мають виявлятися 6 основних піків, відповідних

## Інтерферону бета-1а розчин концентрований

б основним пікам на мас-спектрі ФСЗ інтерферону бета-1а.

С. Пептидне картування (2.2.55) і рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** У поліпропіленову пробірку місткістю 0.5 мл поміщають 5 мкл розчину 242 г/л трис(гідроксиметил)амінометану Р та випробовуваний препарат у кількості, що відповідає 20 мкг білка, додають 4 мкл розчину 1 мг/мл ендонпротеази LysC Р у 0.05 М трис-гідрохлориду буферному розчині рН 9.0 Р, обережно перемішують та інкубують при температурі 30 °С протягом 2 год. Додають 10 мкл розчину 15.4 г/л дитіотреїтолу Р. Одержаний розчин розводять таким самим об'ємом розчину 573 г/л гуанідину гідрохлориду Р та інкубують при температурі 4 °С протягом від 3 год до 4 год.

**Розчин порівняння.** Готують паралельно із випробовуваним розчином із використанням ФСЗ інтерферону бета-1а замість випробовуваного препарату.

**Передколонка:**

- розмір: 0.02 м × 2.1 мм;
- нерухома фаза: сферичний силікагель октадецил-силільний для хроматографії Р (5 мкм) із розміром пор 30 нм.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 2.1 мм;
- нерухома фаза: сферичний силікагель октадецил-силільний для хроматографії Р (5 мкм) із розміром пор 30 нм.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: 1 мл кислоти трифтороцтової Р доводять водою Р до об'єму 1000 мл;
- рухома фаза В: 1 мл кислоти трифтороцтової Р розчиняють у 700 мл ацетонітрилу для хроматографії Р, потім доводять водою Р до об'єму 1000 мл;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 30	100 → 64	0 → 36
30 - 45	64 → 55	36 → 45
45 - 50	55 → 40	45 → 60
50 - 70	40 → 0	60 → 100
70 - 83	0	100
83 - 85	0 → 100	100 → 0

**Швидкість рухомої фази:** 0.2 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Об'єм інжекції:** об'єм, що відповідає 20 мкг гідролізованого білка.

**Придатність хроматографічної системи:** хроматограма розчину порівняння має бути якісно співвісна із хроматограмою гідролізату інтерферону бета-1а, що додається до ФСЗ інтерферону бета-1а.

**Результати:** профіль хроматограми випробовуваного розчину має відповідати профілю хроматограми розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Домішки із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси інтерферону бета-1а.** Випробування проводять методом електрофорезу у поліакриламідному гелі (2.2.31) у відновлювальних умовах.

**Розділювальний гель.** 12 % акриламід.

**Буферний розчин для зразків концентрований.** ДСН-ПАГ буферний розчин для зразків концентрований (відновлювальні умови) Р, що містить 2-меркаптоетанол як відновлювальну речовину.

**Буферний розчин для зразків.** Змішують рівні об'єми ДСН-ПАГ буферного розчину для зразків концентрованого (відновлювальні умови) Р та води Р.

**Випробовуваний розчин (а).** Випробовуваний препарат концентрують підходящим методом до вмісту білка 1.5 мг/мл.

**Випробовуваний розчин (б).** Змішують рівні об'єми випробовуваного розчину (а) та буферного розчину для зразків концентрованого.

**Випробовуваний розчин (с).** Випробовуваний розчин (а) розводять до концентрації білка 0.6 мг/мл. Змішують рівні об'єми одержаного розчину та буферного розчину для зразків концентрованого.

**Випробовуваний розчин (д).** Змішують 8 мкл випробовуваного розчину (с) і 40 мкл буферного розчину для зразків.

**Випробовуваний розчин (е).** Змішують 15 мкл випробовуваного розчину (д) і 35 мкл буферного розчину для зразків.

**Випробовуваний розчин (ф).** Змішують 18 мкл випробовуваного розчину (е) і 18 мкл буферного розчину для зразків.

**Випробовуваний розчин (г).** Змішують 12 мкл випробовуваного розчину (ф) і 12 мкл буферного розчину для зразків.

**Розчин порівняння (а).** Розчин зі стандартами молекулярних мас для калібрування ДСН-ПАГ гелів у межах від 15 кДа до 67 кДа. Розчиняють у буферному розчині для зразків.

**Розчин порівняння (б).** Розчин 0.75 мг/мл ФСЗ інтерферону бета-1а у буферному розчині для зразків.

**Підготування зразка:** кип'ятять протягом 3 хв.

**Об'єм зразків, що наносяться:** 20 мкл випробовуваних розчинів від (б) до (г) і розчинів порівняння (а) і (б).

**Виявлення:** забарвлення Кумасі проводять таким чином: гель занурюють у Кумасі забарлювальний розчин Р1 і витримують при температурі від 33 °С до 37 °С

протягом 90 хв, обережно струшуючи, потім видаляють забарвлювальний розчин; гель знебарвлюють великим надтиском суміші *кислота оцтова льодяна Р - 2-пропанол Р - вода Р* (1:1:8).

**Виявлені молекулярні маси:** інтерферону бета-1а — близько 23000; недостатньо глікозильованого інтерферону бета-1а — близько 21000; деглікозильованого інтерферону бета-1а — близько 20000; інтерферону бета-1а димеру — близько 46000.

**Ідентифікація смуг:** використовують електрофореграму, що додається до *ФСЗ інтерферону бета-1а*.

**Придатність системи:**

- валідаційні характеристики мають відповідати вимогам статті (2.2.31);
- на електрофореграмі розчину порівняння (g) має виявлятися смуга;
- інтенсивність забарвлення на електрофореграмах має змінюватися у такому порядку: випробовуваний розчин (b) - випробовуваний розчин (g).

**Нормування:**

- на електрофореграмі випробовуваного розчину (c) смуга недостатньо глікозильованого інтерферону бета-1а має бути не інтенсивнішою за основну смугу на електрофореграмі випробовуваного розчину (e) (5 %);
- на електрофореграмі випробовуваного розчину (b) смуга деглікозильованого інтерферону бета-1а має бути не інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі випробовуваного розчину (e) (2 %); будь-яка інша смуга домішки із молекулярною масою, меншою за молекулярну масу інтерферону бета-1а, крім смуги недостатньо глікозильованого інтерферону бета-1а має бути не інтенсивнішою за основну смугу на електрофореграмі випробовуваного розчину (f) (1 %).

**Окиснений інтерферон бета-1а. Не більше 6 %.**

Використовують хроматограму випробовуваного розчину, одержану при ідентифікації С. Визначають піки білкового фрагмента, що містить амінокислоти 34-45 та їх окиснені форми, використовуючи хроматограму окисненого інтерферону бета-1а, що додається до *ФСЗ інтерферону бета-1а*.

Вміст окисненого інтерферону бета-1а, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_{34-45ox}}{A_{34-45} + A_{34-45ox}} \times 100,$$

де:

$A_{34-45ox}$  — площа піка окисненого білкового фрагмента 34-45;

$A_{34-45}$  — площа піка білкового фрагмента 34-45.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.7 МО в об'ємі, що містить  $1 \times 10^6$  МО інтерферону бета-1а, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування

без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Блок. Рідинна хроматографія (2.2.29).** Готують по 3 окремі розведення кожного розчину.

**Випробовуваний розчин.** Розводять випробовуваний препарат до концентрації 100 мкг/мл.

**Розчин порівняння.** Вміст віали із *ФСЗ інтерфероном бета-1а* розводять до концентрації 100 мкг/мл.

**Передколонка:**

- розмір: 0.02 м × 2.1 мм;
- нерухома фаза: *силікагель бутилсилільний для хроматографії Р* (5 мкм) із розміром пор 30 нм.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 2.1 мм;
- нерухома фаза: *силікагель бутилсилільний для хроматографії Р* (5 мкм) із розміром пор 30 нм.

**Рухома фаза:**

- *рухома фаза А:* розчин 0.1 % (об/об) *кислоти трифтороцтової Р*;
- *рухома фаза В:* до 300 мл *води Р* додають 1 мл *кислоти трифтороцтової Р* і доводять *ацетонітрилом для хроматографії Р* до об'єму 1000 мл;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 20	100 → 0	0 → 100
20 - 25	0	100
25 - 26	0 → 100	100 → 0
26 - 40	100	0

**Швидкість рухомої фази:** 0.2 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Об'єм інжекції:** 50 мкл.

**Час утримування:** інтерферону бета-1а близько 20 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:

- **коефіцієнт симетрії:** від 0.8 до 2.0 для піка інтерферону бета-1а;
- **збіжність:** відносне стандартне відхилення, одержане після інжекції 3 незалежних розведень, не більше 3.0 %.

Вміст інтерферону бета-1а ( $C_{908}H_{1406}N_{246}O_{252}S_4$ ) розраховують із зазначеного вмісту  $C_{908}H_{1406}N_{246}O_{252}S_4$  у *ФСЗ інтерферону бета-1а*.

**Активність**

Активність інтерферону бета-1а оцінюють, порівнюючи його захисну дію на клітини проти вірусної цитопатичної дії із дією відповідного міжнародного стандартного зразка рекомбінантного інтерферону



## Інтерферону гамма-1b розчин концентрований

бета-1a людини або стандартного препарату, каліброваного у Міжнародних Одиницях.

1 Міжнародна Одиниця відповідає активності визначеної кількості певного міжнародного стандартного зразка. Еквівалентність Міжнародних Одиниць міжнародного стандартного зразка визначається Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я.

Кількісне визначення проводять підходящим методом, що базується на таких засадах.

У стандартних культуральних умовах використовують встановлену клітинну лінію, сприйнятливую до дії підходячого цитопатичного вірусу та чутливу до інтерферону. Можуть бути підходящими такі клітинні культури та віруси:

- WISH клітини (ATCC № CCL-25) і вірус везикулярного стоматиту VSV, штам Індіана (ATCC № VR-158) як інфекційний агент;
- A549 клітини (ATCC № CCL-185) і вірус енцефаломіокардиту EMC (ATCC № VR-129B) як інфекційний агент.

У планшетах для мікротитрування інкубують не менше 4 серій клітин у 3 або більше різних розведеннях випробовуваного препарату та стандартного препарату, включаючи до кожної серії як відповідний контроль необроблені клітини. Вибирають концентрації препаратів так, щоб препарати у найменшій концентрації виявляли незначну захисну дію, а препарати у найбільшій концентрації виявляли захисну дію меншу, ніж їх максимальна захисна дія проти дії цитопатичного вірусу. У підходящий час додають цитопатичний вірус до всіх лунок, за винятком лунок із необробленими клітинами. Цитопатичний ефект вірусу визначають кількісно підходящим методом. Обчислюють активність випробовуваного препарату, використовуючи звичайні статистичні методи (наприклад, 5.3).

Встановлена активність має бути не менше 80 % і не більше 125 % заявленої активності. Довірчий інтервал ( $P = 0.95$ ) має бути не менше 64 % і не більше 156 % встановленої активності.

### ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі нижче — 70 °С. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному, повітронепроникному контейнері із контролем першого розкриття.

### МАРКУВАННЯ

Зазначають:

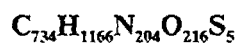
- вміст інтерферону бета-1a, у міліграмах на мілілітр,
- антивірусну активність, у Міжнародних Одиницях на мілілітр.

— якщо необхідно, що субстанція придатна для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

## ІНТЕРФЕРОНУ ГАММА-1b РОЗЧИН КОНЦЕНТРОВАНИЙ

### Interferoni gamma-1b solutio concentrata

#### INTERFERON GAMMA-1b CONCENTRATED SOLUTION



М.м. 16465

Інтерферону гамма-1b розчин концентрований є розчином *N*-кінцевої метіонільної форми інтерферону гамма, білок якого продукується та виділяється людськими антигенстимульованими Т-лімфоцитами у відповідь на вірусні інфекції та різні інші збудники. Він виявляє специфічні імуномодуляторні властивості, наприклад, фагоцитстимульовальну дію. Білок складається із нековалентних димерів двох однакових мономерів. Формула мономеру така:

M

QDPYVKEAEN LKKYFNAGHS DVADNGTLFL GILKNWKEES  
DRKIMQSQIV SFYFKLFKKNF KDDQSIQKSV ETKEDMNVK  
FFNSNKKKRD DFEKLTHTYSV TDLNVQRKAI HELIQVMAEL  
SPAAKTGKRK RSQMLFRGR

Активність інтерферону гамма-1b не менше  $20 \times 10^6$  МО/мг білка. Інтерферону гамма-1b концентрований розчин містить не менше  $30 \times 10^6$  МО інтерферону гамма-1b у мілілітрі.

### ВИРОБНИЦТВО

Інтерферону гамма-1b розчин концентрований одержують за допомогою технології рекомбінантної ДНК, використовуючи як клітини-хазяїни бактерії. Інтерферону гамма-1b розчин концентрований одержують в умовах, що мінімізують мікробіологічне забруднення.

Інтерферону гамма-1b розчин концентрований має витримувати наведені нижче додаткові випробування.

**Залишкові білки клітини-хазяїна.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

**Залишкова ДНК клітини-хазяїна та вектора.** Межі встановлюються компетентним уповноваженим органом.

## ВЛАСТИВОСТІ

Прозора безбарвна або світло-жовтава рідина.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Інтерферону гамма-1b розчин концентрований має відповідати вимогам щодо передбачуваної біологічної активності, зазначеним у розділі «Кількісне визначення».

**В.** Переглядають електрофореграму, одержану в умовах випробування на домішки із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси інтерферону гамма-1b. На електрофореграмі випробовуваного розчину мають виявлятися основні смуги на рівні основних смуг на електрофореграмі розчину порівняння (а).

**С.** Випробування проводять методом пептидного картування.

*Розчин А.* Готують розчин, що містить 1.2 г/л трис(гідроксиметил)амінометану Р, 8.2 г/л натрію ацетату безводного Р, 0.02 г/л кальцію хлориду Р, і доводять рН до 8.3 кислотою оцтовою розведеною Р. До одержаного розчину додають полісорбат 20 Р до концентрації 0.1 % (об/об).

*Випробовуваний розчин.* Препарат знесолюють до вмісту 1 мг білка підходящим методом. Наприклад, фільтрують у мікроцентрифужній пробірці, розводять 500 мкл розчину А, додають 10 мкл свіжоприготованого розчину 1 мг/мл трипсину для пептидного картування Р у воді Р, обережно перемішують, інкубують при температурі від 30 °С до 37 °С протягом 24 год, додають 100 мкл кислоти фосфорної Р на 1 мл гідролізованого зразка та перемішують.

*Розчин порівняння.* Розводять ФСЗ інтерферону гамма-1b у воді Р до концентрації 1 мг/мл і далі вчиняють так, як описано для випробовуваного розчину.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.15 м × 4.6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р (10 мкм);
- швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв;

*Рухома фаза А (0.05 М натрію фосфату буферний розчин рН 3.3).* Розчин I: 7.80 г натрію дигідрофосфату Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл. Розчин II: 0.33 мл кислоти фосфорної Р доводять водою Р до об'єму 100.0 мл. 920 мл розчину I і 80 мл розчину II змішують і, якщо необхідно, доводять рН.

*Рухома фаза В.* Ацетонітрил для хроматографії Р,

— елюювання проводять за таких умов (якщо необхідно, градієнт може бути модифіковано для кращого розділення гідролізату):

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 30	100 → 80	0 → 20
30 - 50	80 → 60	20 → 40
50 - 51	60 → 30	40 → 70
51 - 59	30	70

- детектування за довжини хвилі 214 нм;
- температура колонки 40 °С.

Урівноважують колонку рухомою фазою А протягом не менше 15 хв. Одержують хроматограму рухомої фази А у наведеному вище градієнті.

Хроматографують 100 мкл випробовуваного розчину та 100 мкл розчину порівняння. Хроматографічна система вважається придатною, якщо хроматограма кожного розчину якісно співставна із хроматограмою гідролізату інтерферону гамма-1b, що надається до відповідного ФСЗ інтерферону гамма-1b. Хроматографічний профіль випробовуваного розчину має відповідати хроматографічному профілю розчину порівняння.

**Д.** Випробування проводять методом визначення послідовності N-кінця.

Використовують автоматичний твердофазовий секвенатор, вчиняють як зазначено в інструкції виробника.

Урівноважують підходящим методом еквівалент 100 мкг інтерферону гамма-1b у розчині 10 г/л амонію гідрокарбонату Р рН 9.0.

Ідентифікують фенілтіогдантоїн (РТН)-амінокислоти, виділені при кожному циклі секвенування методом обернено-фазової рідинної хроматографії. Визначення проводять із використанням колонки та реактивів, рекомендованих для розділення РТН-амінокислот виробником обладнання для секвенування.

Калібрування проводять із використанням:

- суміші РТН-амінокислот, наданої виробником, із скорегованими умовами градієнта для досягнення оптимального розділення всіх амінокислот,
- зразка із холостого циклу секвенування, отриманого як рекомендовано виробником обладнання.

Перші 15 амінокислот мають бути такими:

Met-Gln-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість (2.2.1).** Препарат має бути прозорим.

## Інтерферону гамма-1b розчин концентрований

**Кольоровість** (2.2.2, метод II). Забарвлення препарату має бути не інтенсивнішим за стандарт Y.

**pH** (2.2.3). Від 4.5 до 5.5.

**Ковалентні димери та олігомери.** Не більше 2 %.

Визначення проводять методом ексклюзивної хроматографії (2.2.30).

**Випробовуваний розчин.** Препарат розводять рухомою фазою до концентрації білка 0.1 мг/мл.

**Розчин порівняння (а).** ФСЗ інтерферону гамма-1b розводять рухомою фазою до концентрації білка 0.1 мг/мл.

**Розчин порівняння (b).** Готують суміш таких стандартів молекулярних мас: альбуміну бичачого, овальбуміну, трипсиногену, лізоциму у концентрації від 0.1 мг/мл до 0.2 мг/мл для кожного стандарту.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.3 м × 7.8 мм, заповнена *силікагелем гідрофільним для хроматографії Р*, підходящим для фракціонування глобулярних протеїнів із молекулярною масою від 10000 до 500000, із розміром частинок 5 мкм;
- швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв;
- рухома фаза: суміш, приготована як зазначено нижче (0.2 М натрію фосфатний буферний розчин pH 6.8). Розчин I: 31.2 г *натрію дигідрофосфату Р* і 1.0 г *натрію додецилсульфату Р* розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл. Розчин II: 28.4 г *динатрію гідрофосфату безводного Р* і 1.0 г *натрію додецилсульфату Р* розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл. Змішують 450 мл розчину I і 550 мл розчину II. Якщо необхідно, доводять pH;
- детектування в області довжин хвиль від 210 нм до 214 нм.

Хроматографують по 200 мкл кожного розчину.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо: на хроматограмі розчину порівняння (b) стандарти молекулярної маси добре розділяються; час утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) знаходиться між часом утримування трипсиногену та часом утримування лізоциму на хроматограмі розчину порівняння (b).

Порівнюють хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння (а). На хроматограмі випробовуваного розчину не має бути додаткових плечей або піків порівняно із хроматограмою розчину порівняння (а).

Обчислюють вміст ковалентних димерів і олігомерів, у відсотках.

**Мономери та агрегати.** Не більше 2 % мономерів і агрегатів.

Визначення проводять методом ексклюзивної хроматографії (2.2.30).

**Розчин А.** Готують розчин такого складу: 0.59 г/л *кислоти бурштинової Р*, 40 г/л *маніту Р* і доводять розчином *натрію гідроксиду Р* до pH 5.0.

**Випробовуваний розчин.** Препарат розводять розчином А до концентрації білка 1 мг/мл.

**Розчин порівняння.** ФСЗ інтерферону гамма-1b розводять розчином А до концентрації білка 1 мг/мл.

**Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.** Готують 500 мкл суміші, що містить 0.04 мг/мл *альбуміну бичачого Р* і 0.2 мг/мл *ФСЗ інтерферону гамма-1b* у розчині А. Одержаний розчин використовують протягом не більше 24 год після приготування.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.3 м × 7.8 мм, заповнена *силікагелем гідрофільним для хроматографії Р*, підходящим для фракціонування глобулярних протеїнів із молекулярною масою від 10000 до 300000, із розміром частинок 5 мкм;
- швидкість рухомої фази 0.8 мл/хв;
- рухома фаза: розчин 89.5 г/л *калію хлориду Р* (1.2 М);
- детектування за довжини хвилі 214 нм.

Хроматографують 20 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. На одержаній хроматограмі час утримування основного піка, що відповідає димеру нативного інтерферону гамма-1b, має становити близько 10 хв. Відносний час утримування альбуміну бичачого по відношенню до основного піка має становити близько 0.85. Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт розділення піків альбуміну бичачого та інтерферону гамма-1b становить не менше 1.5.

Хроматографують 20 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння. На хроматограмах виявляються основні піки із однаковими часами утримування. Обчислюють вміст, у відсотках, мономерів та агрегатів із площі піка мономера і піків, що елюються перед піком нативного інтерферону гамма-1b на хроматограмі випробовуваного розчину, методом внутрішньої нормалізації; не враховують піки розчинника.

**Дезаміновані й окиснені форми та гетеродимери.** Не більше 10 % дезамінованих та окиснених форм. Не більше 3 % гетеродимерів.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** Препарат розводять водою Р до концентрації білка 1 мг/мл.

**Розчин порівняння.** ФСЗ інтерферону гамма-1b розводять водою Р до концентрації білка 1 мг/мл.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. Використовують ФСЗ інтерферону гамма-1b розчину для валідації.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.075 м × 7.5 мм, заповнена підходящим гідрофільним поліметакрилатом, сильним катіонообмінним гелем (10 мкм, 100 нм);
- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;
- рухома фаза А (0.05 М амонію ацетату буферний розчин рН 6.5). Розчин 3.86 г/л амонію ацетату Р, рН якого доведено до 6.5 кислотою оцтовою розведеною Р,
- рухома фаза В (1.2 М амонію ацетату буферний розчин рН 6.5). Розчин 92.5 г/л амонію ацетату Р, рН якого доведено до 6.5 кислотою оцтовою розведеною Р,
- елювання проводять за таких умов (якщо необхідно, градієнт може бути модифіковано для крайшого розділення).

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 1	100	0
2 - 30	100 → 0	0 → 100
31 - 35	0	100

- детектування за довжини хвилі 280 нм;
- температура колонки 35 °С.

Хроматографують 25 мкл розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. На одержаній хроматограмі час утримування основного піка становить близько 26 хв. Дезаміновані й окиснені форми елюються одним піком із відносним часом утримування близько 0.95 по відношенню до основного піка. Хроматографічна система вважається придатною, якщо відношення пік/западина становить не менше 1.2.

Хроматографують 25 мкл випробовуваного розчину та 25 мкл розчину порівняння. На хроматограмі мають виявлятися основні піки із такими самими часами утримування. Обчислюють вміст дезамінованого та окисненого інтерферону гамма-1b, у відсотках, як відсоток площі основного піка. Гетеродимери мають відносний час утримування 0.7 і 0.85 по відношенню до основного піка. Обчислюють вміст гетеродимерів, у відсотках, як відсоток суми площ усіх піків.

Домішки із молекулярними масами, відмінними від молекулярної маси інтерферону гамма-1b. Випробування проводять методом електрофорезу у поліакриламідному гелі (2.2.31). Випробування проводять як у відновлювальних, так і у не відновлювальних умовах, використовуючи 15 % акриламідні розділювальні гелі та забарвлювання сріблом як метод виявлення.

Буферний розчин для зразків (не відновлювальні умови). 3.78 г трис(гідроксиметил)амінометану Р, 10.0 г натрію додецилсульфату Р і 0.100 г бромфенолового синього Р розчиняють у воді Р, додають 50.0 мл глі-

церину Р і доводять об'єм розчину водою Р до 80 мл. Доводять рН одержаного розчину кислотою хлористоводневою Р до 6.8 і доводять об'єм розчину водою Р до 100 мл.

Буферний розчин для зразків (відновлювальні умови). 3.78 г трис(гідроксиметил)амінометану Р, 10.0 г натрію додецилсульфату Р і 0.100 г бромфенолового синього Р розчиняють у воді Р, додають 50.0 мл гліцерину Р і доводять об'єм розчину водою Р до 80 мл. Доводять рН (2.2.3) одержаного розчину кислотою хлористоводневою Р до 6.8 і доводять об'єм розчину водою Р до 100 мл. Безпосередньо перед використанням додають дитіотреїтол Р до кінцевої концентрації 250 мМ.

Випробовуваний розчин. Препарат розводять водою Р до концентрації білка 1 мг/мл. 150 мкл одержаного розчину розводять 38 мкл буферного розчину для зразків.

Розчин порівняння (а). Готують аналогічно до випробовуваного розчину із використанням ФСЗ інтерферону гамма-1b замість препарату.

Розчин порівняння (b) (5 нг контроль). Змішують 50 мкл розчину 0.01 мг/мл альбуміну бичачого Р із 2000 мкл води Р і 450 мкл буферного розчину для зразків.

Розчин порівняння (с). (2 нг контроль). Змішують 20 мкл розчину 0.01 мг/мл альбуміну бичачого Р із 2000 мкл води Р і 450 мкл буферного розчину для зразків.

Розчин порівняння (d). Використовують розчин зі стандартами молекулярної маси для калібрування ДСН-ПАГ у межах від 10 кДа до 70 кДа.

Кожний розчин, що міститься у пробірці, витримують при температурі навколишнього середовища протягом 15 хв, потім зберігають у льодяній бані.

По 25 мкл кожного розчину наносять у кишеньки концентруючого гелю. Проводять електрофорез в умовах, зазначених в інструкції до приладу. Виявляють білки у гелі методом забарвлювання сріблом.

Результати випробування вважаються вірогідними, якщо валідаційні характеристики відповідають вимогам статті (2.2.31); на електрофореграмах розчинів порівняння (b) і (с) видима смуга.

На електрофореграмі випробовуваного розчину має виявлятися основна смуга, що за інтенсивністю відповідає основній смузі на електрофореграмі розчину порівняння (а). На електрофореграмі випробовуваного розчину не мають виявлятися смуги, відсутні на електрофореграмі розчину порівняння (а) (0.01 %). Може виявлятися смуга інтенсивніша або такої самої інтенсивності, що і смуга на електрофореграмі розчину порівняння (с).

Норлейцин. Не більше 0.2 молей норлейцину в 1 молі інтерферону гамма-1b. Випробування проводять методом амінокислотного аналізу.

**Інтерферону гамма-1b розчин концентрований**

**Випробовуваний розчин.** 2.5 мл препарату поміщають на колонку, підхожу для знесолення білків, попередньо врівноважену 25 мл розчину 10 % (об/об) кислоти оцтової Р. Елюють зразок з іншими 2.5 мл розчину 10 % (об/об) кислоти оцтової Р. Визначають вміст білка вимірюванням оптичної густини одержаного розчину, як зазначено для визначення білка у розділі «Кількісне визначення». Піпеткою вносять об'єм, еквівалентний 100 мкг інтерферону гамма-1b, до кожного із трьох флаконів та упарюють насухо при зниженому тиску.

Проводять гідроліз трьох зразків, як зазначено нижче. У кожний флакон додають 200 мкл розчину 50 % (об/об) кислоти хлористоводневої Р, що містить 1 % (об/об) фенолу Р, видаляють зразки, очищують азотом і гідролізують у газовій фазі. Нагрівають флакони при температурі 110 °С протягом 22 год, після гідролізу упарюють насухо під зниженим тиском.

Проводять дериватизацію зразків, як зазначено нижче. Безпосередньо перед використанням готують суміш 96 % спирт Р - вода Р - триетиламін Р (2:1:1). 50 мкл одержаного розчину додають у кожний флакон, злегка струшують та упарюють насухо під зниженим тиском. У кожний флакон додають 50 мкл суміші 96 % спирт Р - вода Р - триетиламін Р - фенілізотіоціонат Р (7:1:1:1), злегка струшують, витримують при кімнатній температурі протягом 15 хв і упарюють насухо під зниженим тиском. Відновлюють зразки у 250 мкл рухомої фази А.

**Вихідний розчин норлейцину.** Готують розчин 250 нмоль/мл DL-норлейцину Р у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Одержаний розчин можна зберігати протягом 2 міс при температурі 4 °С.

**Вихідний розчин лейцину.** Готують розчин 250 нмоль/мл лейцину Р у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої. Одержаний розчин може зберігатися протягом 2 міс при температурі 4 °С.

**Розчин порівняння.** У кожному із трьох флаконів змішують по 10 мкл вихідного розчину норлейцину із 100 мкл вихідного розчину лейцину та упарюють насухо під зниженим тиском. Проводять дериватизацію зразків, як зазначено для випробовуваного розчину.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ- детектором за таких умов:

- колонка із нержавіючої сталі розміром 0.15 м × 3.9 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р (4 мкм);
- швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв:

**Рухома фаза А.** Розчин 19 г/л натрію ацетату Р, що містить 0.05 % (м/м) триетиламіну Р, і рН якого доведено до 6.4 кислотою оцтовою розведеною Р - рухома фаза В (70:30).

**Рухома фаза В.** Вода Р - ацетонітрил Р (40:60),

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітки
0 - 7	100	0	ізократичний режим
7 - 7.1	100 → 0	0 → 100	лінійний градієнт
7.1 - 10	0	100	промивання колонки
10 - 10.1	0 → 100	100 → 0	лінійний градієнт
10.1 - 15	100	0	повторне урівноваження колонки

— детектування за довжини хвилі 254 нм.

— температура колонки 43 °С.

Хроматографують по 50 мкл кожного розчину.

На хроматограмі випробовуваного розчину ідентифікують піки лейцину та норлейцину. Час утримання норлейцину становить від 6.2 хв до 7 хв.

Обчислюють вміст норлейцину (у молях норлейцину в 1 молі інтерферону гамма-1b) із площ піків лейцину та норлейцину на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину, враховуючи, що 1 моль інтерферону гамма-1b містить 10 моль лейцину.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 5 МО в об'ємі, що містить  $20 \times 10^6$  МО інтерферону гамма-1b.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Блок (2.2.25).** Препарат розводять водою Р до концентрації 1 мг/мл. Записують спектр в області довжин хвиль від 220 нм до 340 нм. Вимірюють оптичну густину в максимумі за довжини хвилі 280 нм після коригування незначного розсіювання, що відповідає каламутності за довжини хвилі 316 нм. Обчислюють концентрацію інтерферону гамма-1b, використовуючи питомий показник поглинання, що дорівнює 7.5.

**Активність**

Активність інтерферону гамма-1b визначають, оцінюючи зростання експресії лейкоцитарного антигену DR людини (HLA-DR), обумовлене інтерфероном гамма-1b, наявним у випробовуваних розчинах протягом культивування, і порівнюючи це зростання із аналогічною дією відповідного міжнародного стандартного зразка рекомбінантного інтерферону гамма людини або стандартного препарату, каліброваного у Міжнародних Одиницях.

1 Міжнародна Одиниця відповідає активності визначеної кількості певного міжнародного стандартного зразка. Еквівалентність Міжнародних Одиниць міжнародного стандартного зразка визначається Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я.

## Інтерферону гамма-1b розчин концентрований

Кількісне визначення проводять підходящим методом, що базується на таких засадах.

У стандартних умовах культивування використовують клітини COLO 205. Трипсинізують культури у флаконах із 3 - 5-денними клітинами COLO 205 та готують суспензію клітин із концентрацією  $1.0 \times 10^6$  клітин у мілілітрі.

До всіх лунок 96-лункового планшету для мікротитрування додають по 100 мкл середовища для розведення. По 100 мкл цього середовища додатково вносять у лунки, призначені для контролю. По 100 мкл кожного випробовуваного розчину вносять на планшет і проводять серії двократних розведень для побудови стандартної кривої. Потім додають по 100 мкл суспензії клітин до всіх лунок та інкубують планшет у належних для культивування клітин умовах.

Після культивування видаляють середовище вирощування, промивають та фіксують клітини на планшеті. Додають антитіла, здатні виявити експресію

HLA-DR, що відповідає інтерферону гамма-1b, та інкубують у належних умовах. Після промивання планшети інкубують із антитілами, кон'югованими з маркерним ферментом, здатним виявляти анти-HLA-DR антитіла. Після цієї інкубації промивають планшету та додають належний розчин субстрату. Реакцію припиняють. Вимірюють оптичну густину одержаного розчину та обчислюють активність препарату, використовуючи звичайні статистичні методи.

Встановлена активність має бути не менше 80 % і не більше 125 % заявленої активності. Довірчий інтервал ( $P = 0.95$ ) встановленої активності має бути не менше 70 % і не більше 140 % заявленої активності.

### ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі  $-70^\circ\text{C}$ .

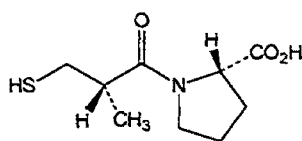


## К

## КАПТОПРИЛ

## Captoprilum

## CAPTOPRIL



$C_9H_{15}NO_3S$   
[62571-86-2]

М.м. 217.3

(2S)-1-[(2S)-2-Метил-3-сульфанілпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота.

Вміст: від 98.0 % до 101.5 %, у перерахунку на суху речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** ▽ Розчинний у воді Р<sub>4</sub>, легко розчинний у метанолі Р і метиленхлориді Р.

(Розчиняється у розведених розчинах гідроксидів лужних металів.)

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

■

▾ А. Субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного обертання, зазначеним у розділі «Питоме оптичне обертання».

В. Адсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ каптоприлу.

■

## ВИПРОБУВАННЯ

**Розчин S.** 0.5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчином до 25 мл.

**Прозорість розчину (2.2.1).** Розчин S має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод I).** Розчин S має бути безбарвним.

**pH (2.2.3).** Від 2.0 до 2.6. Вимірюють pH розчину S.

▾ **Питоме оптичне обертання (2.2.7).** Від  $-127^\circ$  до  $-132^\circ$ , у перерахунку на суху речовину.

0.250 г субстанції розчиняють в етанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

**Домішка F.** Газова хроматографія (2.2.28).

**Розчин реактиву.** До 17.2 мл метанолу безводного Р краплями при температурі  $0^\circ\text{C}$  додають 2.8 мл ацетилхлориду Р і перемішують. Перед використанням витримують при кімнатній температурі протягом 20 хв.

**Випробовуваний розчин.** 20.0 мг субстанції поміщують у віалу, додають 1.0 мл розчину реактиву, перемішують, нагрівають при температурі  $60^\circ\text{C}$  протягом 30 хв і упарюють насухо у потоці азоту Р. Одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл етилацетату Р, додають 0.5 мл пентафторпропіонового ангідриду Р, перемішують, нагрівають при температурі  $60^\circ\text{C}$  протягом 30 хв і упарюють насухо у потоці азоту Р. Одержаний залишок розчиняють у 0.5 мл бутилацетату Р.

**Розчин порівняння (а).** Вміст віали ФСЗ каптоприлу для перевірки придатності хроматографічної системи (містить домішку F) розчиняють у 1.0 мл розчину реактиву. Далі вчиняють як описано для випробовуваного розчину.

**Розчин порівняння (б).** 0.25 мл розчину порівняння (а) змішують із 0.75 мл бутилацетату Р.

**Колонка:**

— матеріал: кварц;

— розмір: 25 м × 0.32 мм;

— нерухома фаза: полі(диметил)(дифеніл)силоксан Р (товщина шару 1 мкм).

**Газ-носії:** гелій для хроматографії Р.

**Швидкість газу-носія:** 1.2 мл/хв.

**Поділ потоку:** 1:20.



**Каптоприл**

Температура:

	Час (хв)	Температура (°C)
Колонка	0 - 10	200
	10 - 14	200 → 240
	14 - 34	240
Блок вводу проб		270
Детектор		300

Детектор: полуменево-іонізаційний.

Об'єм інжекції: 1 мкл.

Відносні часи утримування до каптоприлу (час утримування каптоприлу близько 6 хв): домішки F — близько 0.96.

Придатність хроматографічної системи:

- коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків домішки F та каптоприлу на хроматограмі розчину порівняння (a);
- відношення сигнал/шум: не менше 10 для піка домішки B на хроматограмі розчину порівняння (b).

Вміст домішки F, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A}{A+B} \times 100,$$

де:

- A — площа піка домішки F на хроматограмі випробовуваного розчину;
- B — площа піка каптоприлу на хроматограмі випробовуваного розчину.

Нормування:

- домішка F: не більше 0.2 %.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Суміш розчинників: кислота фосфорна P - ацетонітрил P1 - вода P (0.8:100:900).

Випробовуваний розчин. 0.125 г субстанції розчиняють у суміші розчинників і доводять об'єм розчину сумішшю розчинників до 25.0 мл.

Розчин порівняння (a). 5.0 мг ФСЗ каптоприлу домішки B, 5.0 мг ФСЗ каптоприлу домішки C і 5.0 мг ФСЗ каптоприлу домішки D розчиняють у суміші розчинників, додають 1.0 мл випробовуваного розчину та доводять об'єм розчину сумішшю розчинників до 50.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять сумішшю розчинників до об'єму 20.0 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (b). 5 мг субстанції і 5 мг ФСЗ каптоприлу домішки E розчиняють в ацетонітрилі P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл. 4 мл одержаного розчину доводять сумішшю розчинників до об'єму 50.0 мл.

Розчин порівняння (c). Для приготування домішки A *in situ* 1.0 мл випробовуваного розчину поміщають у мірну колбу та додають 230 мкл 0.05 M розчину йоду.

Якщо розчин не знебарвлюється, додають краплями 0.1 M розчин натрію тіосульфату до знебарвлення розчину та доводять об'єм розчину сумішшю розчинників до 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять сумішшю розчинників до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (d). 1.0 мл випробовуваного розчину доводять до об'єму 100.0 мл сумішшю розчинників.

Колонка:

- розмір: 0.3 м × 3.9 мм;
- нерухома фаза: силікагель ендкепований октадецил-силільний для хроматографії P (10 мкм);
- температура: 50 °C.

Рухома фаза:

- рухома фаза A: кислота фосфорна P - вода P (0.8:1000);
- рухома фаза B: кислота фосфорна P - ацетонітрил P1 - вода P (0.8:500:500);

Час (хв)	Рухома фаза A (% об/об)	Рухома фаза B (% об/об)
0 - 5	90	10
5 - 20	90 → 50	10 → 50
20 - 45	50	50

Швидкість рухомої фази: 1.5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

Об'єм інжекції: 25 мкл.

Ідентифікація домішок: використовують хроматограму розчину порівняння (a) для ідентифікації піків домішок B, C і D; використовують хроматограму розчину порівняння (b) для ідентифікації піка домішки E; використовують хроматограму розчину порівняння (c) для ідентифікації піка домішки A.

Відносні часи утримування до каптоприлу (час утримування каптоприлу близько 15 хв): домішки C — близько 0.6; домішки D — близько 0.8; домішки E — близько 0.9; домішки B — близько 1.3; домішки A — близько 1.7.

Придатність хроматографічної системи:

- коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків домішки E та каптоприлу на хроматограмі розчину порівняння (b).

Нормування:

- домішка A: площа піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (1.0 %);
- домішки B, C, D: площа піка кожної домішки не має перевищувати 1.5 площі відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.15 %);
- домішка E: площа піка не має перевищувати 1.5 площі піка каптоприлу на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.15 %);
- неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу піка капто-

прилу на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.10 %):

- *сума домішок*: сума площ піків усіх домішок не має перевищувати 1.2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (1.2 %);
- *не враховують*: піки, площа яких становить 0.5 площі піка каптоприлу на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.05 %).

**Важкі метали (2.4.8, метод H).** Не більше 0.002 % (20 ppm).

*Розчинник: вода P.*

0.50 г субстанції має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 1 мл *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) P.*▲

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 1.0 %. 1.000 г субстанції сушать під високим вакуумом при температурі 60 °C протягом 3 год.

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

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.150 г субстанції розчиняють у 30 мл *води P* і титрують 0.05 M *розчину йоду P* потенціометрично (2.2.20), використовують комбінований платиновий електрод.

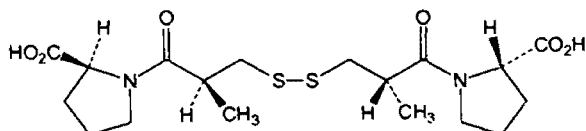
1 мл 0.05 M *розчину йоду P* відповідає 21.73 мг  $C_9H_{15}NO_3S$ .

■

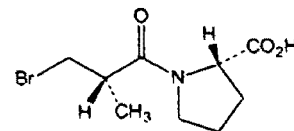
## ДОМІШКИ

▼ *Специфіковані домішки: А, В, С, D, Е, F.*

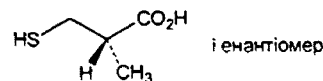
*Інші домішки, що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає потреби їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): G, H, I, J, L, M, N, O.*



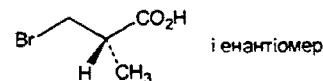
**A.** 1,1'-[дисульфандіілбіс[(2S)-2-метил-1-оксoproпан-3,1-дііл]]біс[(2S)-піролідин-2-карбонова] кислота (каптоприлу дисульфід).



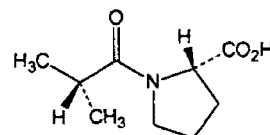
**B.** (2S)-1-[(2S)-3-бром-2-метилпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота,



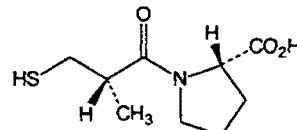
**C.** (2RS)-2-метил-3-сульфанілпропанова кислота,



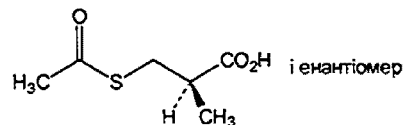
**D.** (2RS)-3-бром-2-метилпропанова кислота,



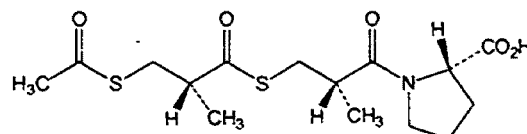
**E.** (2S)-1-(2-метилпропаноїл)піролідин-2-карбонова кислота,



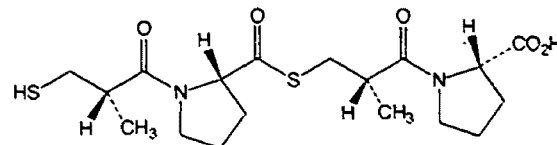
**F.** (2S)-1-[(2R)-2-метил-3-сульфанілпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота (*eni*-каптоприл),



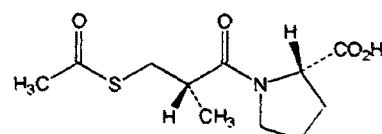
**G.** (2RS)-3-(ацетилсульфаніл)-2-метилпропанова кислота,



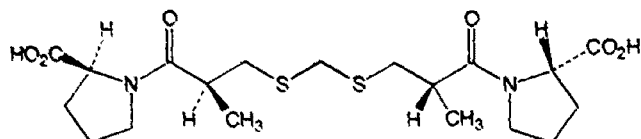
**H.** (2S)-1-[(2S)-3-[[[(2R)-3-(ацетилсульфаніл)-2-метилпропаноїл]-сульфаніл]-2-метилпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота,



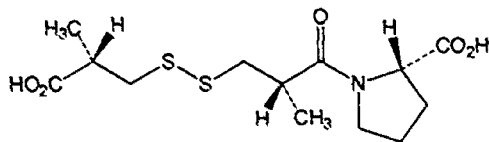
**I.** (2S)-1-[(2S)-3-[[[(2S)-1-[(2S)-2-метил-3-сульфанілпропаноїл]-піролідин-2-іл]карбоніл]сульфаніл]-2-метилпропаноїл]-піролідин-2-карбонова кислота,



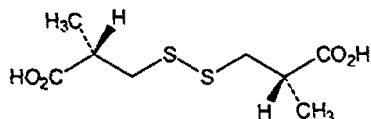
**J.** (2S)-1-[(2S)-3-(ацетилсульфаніл)-2-метилпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота (ацетилкаптоприл),

**Клонідину гідрохлорид**

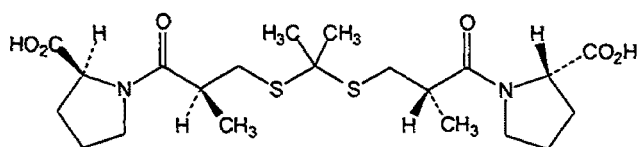
**Л.** 1,1'-(метилєнбїс[сульфандїїл]((2S)-2-метил-1-оксопропан-3,1-дїїл)]бїс[(2S)-пїролїдїн-2-карбонова]кїслота.



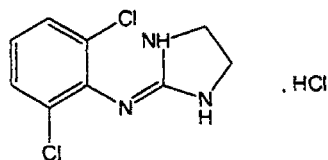
**М.** (2S)-1-[(2S)-2-карбоксипропїл]дїсульфанїл]-2-метилпропаноїл]пїролїдїн-2-карбонова кїслота,



**Н.** 3,3'-дїсульфандїїлбїс[(2S)-2-метилпропанова]кїслота,



**О.** 1,1'-[пропан-2,2-дїїлбїс[сульфаненїл]((2S)-2-метил-1-оксопропан-3,1-дїїл)]бїс[(2S)-пїролїдїн-2-карбонова]кїслота.▲

**КЛОНІДИНУ ГІДРОХЛОРИД****Clonidini hydrochloridum****CLONIDINE HYDROCHLORIDE**

$C_9H_{10}Cl_2N_3$   
[4205-91-8]

М.м. 266.6

▼ 2,6-Дїхлор-N-(їмїдазолїдїн-2-їлідєн)анїлїн гїдрохлорид.▲

**Вміст:** від 98.5 % до 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

**ВЛАСТИВОСТІ**

**Опис.** Кристалїчний порошок бїлого або майже бїлого кольору.

**Розчинність.** Розчинний у водї P і в етанолї P▲.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**Перша ідентифїкація:** В, D.

**Друга ідентифїкація:** А, С, D.

**А.** Абсорбційна спектروفотометрія в ультрафіолєтовїй і видимїй областях (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** 30.0 мг субстанції розчиняють у 0.01 М розчинї кїслоти хлорїстоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Область довжин хвиль:** від 245 нм до 350 нм.

**Абсорбційні максимуми:** за довжин хвиль 272 нм і 279 нм.

**Точка перегину:** за довжини хвилї 265 нм.

**Питомий показник поглинання у максимумах:**

— за довжини хвилї 272 нм: близько 18;

— за довжини хвилї 279 нм: близько 16.

**В.** Абсорбційна спектروفотометрія в інфрачервонїй областї (2.2.24).

**Відповідність:** спектру ФСЗ клонїдїну гїдрохлорїду.

▼ **С.** Тонкошарова хроматографїя (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** 5 мг субстанції розчиняють у метанолї P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

**Розчин порївняння.** 5 мг ФСЗ клонїдїну гїдрохлорїду розчиняють у метанолї P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром сїлікагелю G P.

**Рухома фаза:** кїслота оцтова льодяна P - бутанол P - вода P (10:40:50); витримують до роздїлення шарїв, фїльтрують верхнїй шар і використовують фїльтрат.

**Об'єм проби, що наноситься:** 10 мкл.

**Вїдстань, що має пройти рухома фаза:** 2/3 довжини пластинки.

**Висушування:** на повітрї.

**Виявлення:** обпрїскують розчином калїю йодовїсмутату P2 і сушать на повітрї протягом 1 год. Потїм знову обпрїскують розчином калїю йодовїсмутату P2 і вїдразу обпрїскують розчином 50 г/л натрїю нїтрату P.

**Результати:** на хроматограмї випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рївнї основної плями на хроматограмї розчину порївняння, вїдповїдна їй за розміром і забарвленням.▲

**D.** Субстанція дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Розчин S.** 1.25 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл.

**Прозорість розчину (2.2.1).** Розчин S має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2. метод II).** Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за еталон Y.

**pH (2.2.3).** Від 4.0 до 5.0. Вимірюють pH розчину S.

▼ **Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** 50 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

**Розчин порівняння (а).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 5 мг ФСЗ клонідину домішки В розчиняють у 2 мл ацетонітрилу Р і доводять рухомою фазою А до об'єму 5 мл. До 1 мл одержаного розчину додають 1 мл випробовуваного розчину і доводять рухомою фазою А до об'єму 10 мл.

**Колонка:**

- розмір: 0.15 м × 3.0 мм;
- нерухома фаза: силікагель пропілсилільний для хроматографії Р (5 мкм);
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:**

- рухома фаза А: 4 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у 1000 мл води Р і доводять pH кислотою фосфорною Р до 4.0;
- рухома фаза В: рухома фаза А - ацетонітрил Р І (25:75);

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0	90	10
0 - 15	90 → 30	10 → 70
15 - 15.1	30 → 90	70 → 10
15.1 - 20	90	10

**Швидкість рухомої фази:** 1.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

**Об'єм інжекції:** 5 мкл.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

- коефіцієнт розділення: не менше 5 для піків клонідину та домішки В.

**Нормування:**

- неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного

піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.10 %),

— **сума домішок:** сума площ піків не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.2 %),

— **не враховують:** піки, площа яких становить 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %).▲

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять із 1.0 г субстанції.

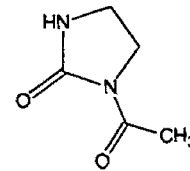
## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.200 г субстанції розчиняють у 70 мл 96 % спирту Р і титрують 0.1 М розчином натрію гідроксиду етанольним потенціометрично (2.2.20).

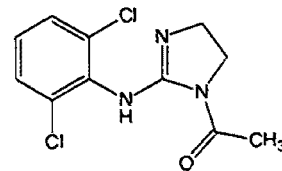
1 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 26.66 мг C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>.

## ▼ ДОМІШКИ

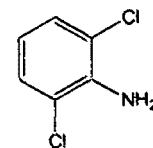
**Інші домішки, що виявляються** (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): А, В, С.



А. 1-ацетилімідазолідин-2-он,



В. 1-ацетил-2-[(2,6-дихлорфеніл)аміно]-4,5-дигідро-1Н-імідазол,



С. 2,6-дихлоранілін.▲

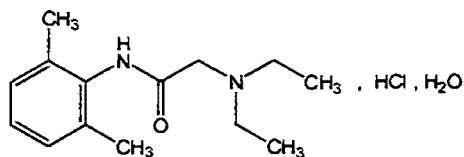


## Л

## ЛІДОКАЇНУ ГІДРОХЛОРИД

## Lidocaini hydrochloridum

## LIDOCAINE HYDROCHLORIDE



$C_{14}H_{23}ClN_2O, H_2O$   
[6108-05-0]

М.м.288.8

2-(Діетиламіно)-*N*-(2,6-диметилфеніл)ацетамід гідрохлорид ▽ моногідрат ▲.

*Вміст:* не менше 99.0 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

*Розчинність.* Дуже легко розчинний у воді *P*, легко розчинний у 96 % спирті *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

▽ *Перша ідентифікація:* В, D.

Друга ідентифікація: А, С, D. ▲

**А.** Температура плавлення (2.2.14). Від 74 °С до 79 °С. Визначення проводять без попереднього висушування субстанції.

**В.** Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ лідокаїну гідрохлориду.

**С.** До близько 5 мг субстанції додають 0.5 мл кислоти азотної димлячої *P*, упарюють насухо на водяній бані, охолоджують, залишок розчиняють у 5 мл ацетону *P*, додають 0.2 мл розчину калію гідроксиду спиртового *P*; з'являється зелене забарвлення.

■

**D.** Субстанція дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБОВУВАННЯ

**Розчин S.** 1.0 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

**Прозорість розчину.** (2.2.1). Розчин S має бути прозорим.

**Кольоровість розчину** (2.2.2, метод II). Розчин S має бути безбарвним.

**pH** (2.2.3). Від 4.0 до 5.5. 1 мл розчину S доводять водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P* до об'єму 10 мл.

■

▽ **Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 50.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 50.0 мг 2,6-диметиланіліну *P* (домішка А) розчиняють у рухомій фазі і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 5 мг 2-хлор-*N*-(2,6-диметилфеніл)ацетаміду *P* (домішка Н) розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Розчин порівняння (c).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (d).* 1.0 мл розчину порівняння (а) змішують з 1.0 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (c) і доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.15 м × 3.9 мм;

— нерухома фаза: полімер кремніеорганічний аморфний октадецилсильний ендкеповний із полярною вставкою *P* (5 мкм);

— температура: 30 °С.

*Рухома фаза:* ацетонітрил для хроматографії *P*-розчин 4.85 г/л калію дигідрофосфату *P*, рН якого до-

**Лідокаїну гідрохлорид**

ведено до 8.0 розчином натрію гідроксиду концентрованим Р, (30:70).

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 230 нм.

Об'єм інжекції: 20 мкл.

Час хроматографування: у 3.5 разів більше часу утримування лідокаїну.

Відносні часи утримування до лідокаїну (час утримування лідокаїну близько 17 хв): домішки Н — близько 0.37; домішки А — близько 0.40.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (d):

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків домішок Н та А.

Нормування:

— домішка А: площа піка має становити не більше площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.01 %);

— неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу піка лідокаїну на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.10 %);

— сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 5 площ піка лідокаїну на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.5 %);

— не враховують: піки, площа яких становить 0.5 площі піка лідокаїну на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.05 %).▲

**Важкі метали (2.4.8, метод Е).** Не більше 0.0005 % (5 ppm). 1.0 г субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл. Проводять передфільтрацію. 10 мл одержаного фільтрату мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 2 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) Р.

**Вода (2.5.12).** Від 5.5 % до 7.0 %. Визначення проводять із 0.25 г субстанції.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять із 1.0 г субстанції.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

0.220 г субстанції розчиняють у 50 мл 96 % спирту Р, додають 5.0 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої і титрують 0.1 М розчином натрію гідроксиду потенціометрично (2.2.20). У розрахунок беруть об'єм титранту між двома стрибками потенціалів на кривій титрування.

1 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 27.08 мг  $C_{14}H_{23}ClN_2O$ .

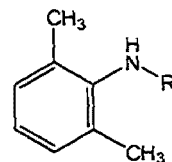
**ЗБЕРІГАННЯ**

У захищеному від світла місці.

**ДОМІШКИ**

▼ Специфіковані домішки: А.

Інші домішки, що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть бути визначені тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також (5.10.) «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): В, С, D, E, F, G, H, I, J, K.



A. R = H : 2,6-диметиланілін,

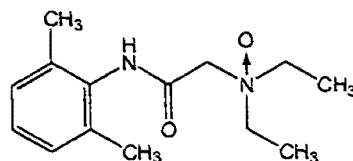
C. R = CO-CH<sub>3</sub> : N-(2,6-диметилфеніл)ацетамід,

D. R = CO-CH<sub>2</sub>-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> : N-(2,6-диметилфеніл)-2-(етиламіно)ацетамід,

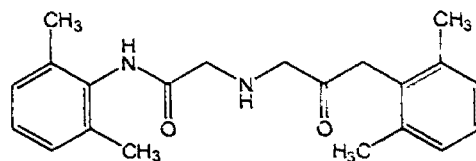
G. R = CO-CH<sub>2</sub>-NH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> : N-(2,6-диметилфеніл)-2-[(1-метилетил)аміно]ацетамід,

H. R = CO-CH<sub>2</sub>-Cl : 2-хлор-N-(2,6-диметилфеніл)ацетамід,

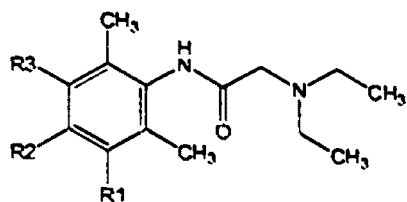
K. R = CO-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> : N-(2,6-диметилфеніл)-2-(етилметиламіно)ацетамід,



B. 2-(діетилазіноіл)-N-(2,6-диметилфеніл)ацетамід(лідокаїн N<sup>2</sup>-оксид),



E. 2,2'-(азанедііл)біс[N-(2,6-диметилфеніл)ацетамід],



I. R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>: 2-(діетиламіно)-*N*-(2,4-диметилфеніл)ацетамід.

J. R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>: 2-(діетиламіно)-*N*-(2,5-диметилфеніл)ацетамід. ▴

F. R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H: 2-(діетиламіно)-*N*-(2,3-диметилфеніл)ацетамід.





# П

## ПОВІТРЯ МЕДИЧНЕ

### Aer medicinalis

#### AIR, MEDICINAL

Зріджене оточуюче повітря.

*Вміст:* не менше 20.4 % (об/об) і не більше 21.4 % (об/об) кисню ( $O_2$ ).

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Безбарвний газ.

*Розчинність.* 1 об'єм повітря розчиняється у близько 50 об'ємах води *P* при температурі 20 °C і тиску 101 кПа.

#### ВИРОБНИЦТВО

*Вуглецю діоксид.* Не більше 0.05 % (500 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням інфрачервоного аналізатора (2.5.24).

*Випробовуваний зразок.* Випробовувану субстанцію фільтрують для видалення частинок, що спричинюють явище розсіювання світла.

*Зразок порівняння (а).* Суміш 21 % (об/об) кисню *P* і 79 % (об/об) азоту *P1*, що містить менше 1 ppm (0.0001 %) (об/об) вуглецю діоксиду *P1*.

*Зразок порівняння (б).* Суміш 21 % (об/об) кисню *P* і 79 % (об/об) азоту *P1*, що містить 500 ppm (0.05 %) (об/об) вуглецю діоксиду *P1*.

Калібрують прилади та визначають чутливість із використанням зразків порівняння (а) та (б). Вимірюють вміст вуглецю діоксиду у випробовуваному зразку.

*Вуглецю оксид.* Не більше 0.0005 % (5 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням інфрачервоного аналізатора (2.5.25).

*Випробовуваний зразок.* Випробовувану субстанцію фільтрують для видалення частинок, що спричинюють явище розсіювання світла.

*Зразок порівняння (а).* Суміш 21 % (об/об) кисню *P* і 79 % (об/об) азоту *P1*, що містить менше 1 ppm (0.0001 %) (об/об) вуглецю монооксиду *P*.

*Зразок порівняння (б).* Суміш 21 % (об/об) кисню *P* і 79 % (об/об) азоту *P1*, що містить 5 ppm (0.0005 %) (об/об) вуглецю монооксиду *P*.

Калібрують прилади та визначають чутливість із використанням зразків порівняння (а) та (б). Вимірюють вміст вуглецю оксиду у випробовуваному зразку.

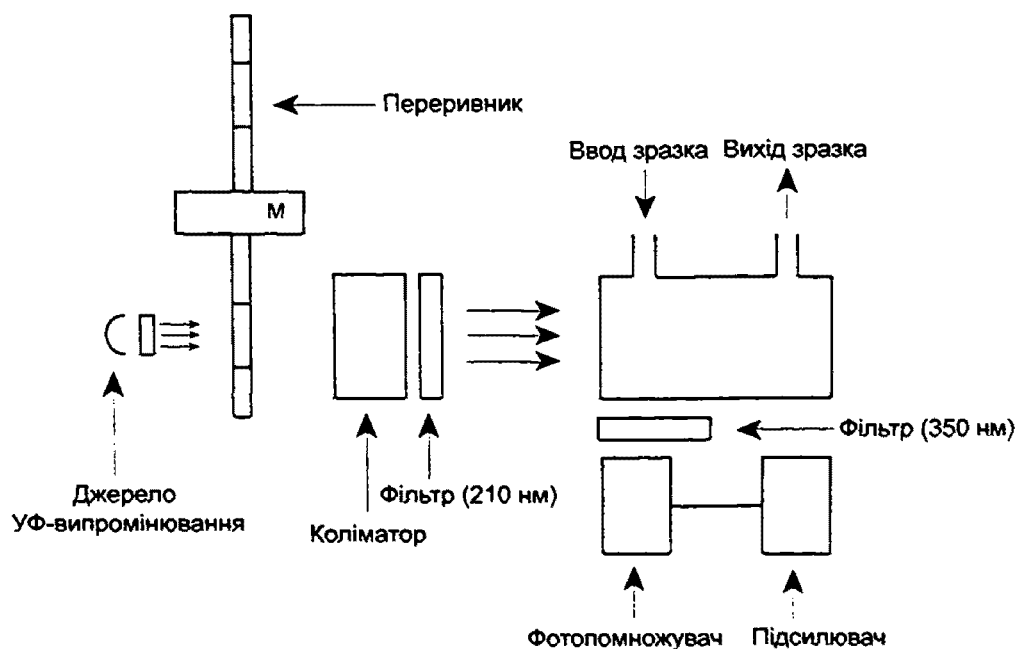


Рисунок 1238.-1. Ультрафіолетовий флуоресцентний аналізатор

**Сірки діоксид.** Не більше 0.0001 % (1 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням ультрафіолетового флуоресцентного аналізатора (Рисунок 1238.-1).

Складовими обладнання є:

- система генерування УФ-випромінювання із довжиною хвилі 210 нм, що складається із УФ-лампи, коліматора та селективного фільтра; випромінювання періодично блокується переривником, що обертається із високою швидкістю;
- реакційна камера, через яку проходить потік випробовуваного газу;
- система детектування випромінювання за довжини хвилі 350 нм, що складається із селективного фільтра, фотопомножувача та підсилювача.

*Випробовуваний зразок.* Випробовувану субстанцію фільтрують.

*Зразок порівняння (а).* Суміш 21 % (об/об) кисню  $P_1$  і 79 % (об/об) азоту  $P_1$ .

*Зразок порівняння (б).* Суміш 21 % (об/об) кисню  $P_1$  і 79 % (об/об) азоту  $P_1$ , що містить від 0.5 ppm (0.00005 %) (об/об) до 2 ppm (0.0002 %) (об/об) сірки діоксиду  $P_1$ .

Калібрують прилади та визначають чутливість із використанням зразків порівняння (а) та (б). Вимірюють вміст сірки діоксиду у випробовуваному зразку.

**Масло.** Не більше 0.1 мг/м<sup>3</sup>, якщо для виробництва використовують масляний компресор. Визначення проводять із використанням індикаторної трубки для масла (2.1.6).

**Азоту оксид і азоту діоксид.** Не більше 0.0002 % (2 ppm) (об/об) у сумі. Визначення проводять із використанням хемілюмінесцентного аналізатора (2.5.26).

*Випробовуваний зразок.* Випробовувана субстанція.

*Зразок порівняння (а).* Суміш 21 % (об/об) кисню  $P_1$  і 79 % (об/об) азоту  $P_1$ , що містить менше 0.05 ppm (0.000005 %) (об/об) азоту оксиду та азоту діоксиду.

*Зразок порівняння (б).* Суміш 2 ppm (0.0002 %) (об/об) азоту монооксиду  $P$  в азоті  $P_1$ .

Калібрують прилади та визначають чутливість із використанням зразків порівняння (а) та (б). Вимірюють вміст азоту оксиду та азоту діоксиду у випробовуваному зразку.

**Вода.** Не більше 0.0067 % (67 ppm) (об/об). Визначення проводять із використанням електролітичного гігрометра (2.5.28). За дозволом компетентного уповноваженого органу для медичного повітря, одержаного на місці використання, та яке подається по системі із тиском не більше 10 бар і температурі не менше 5 °С, можуть бути застосовні такі межі: не більше 0.0870 % (870 ppm) (об/об); визначення проводять із використанням електролітичного гігрометра (2.5.28).

**Кількісне визначення.** Визначення вмісту кисню у повітрі проводять із використанням парамагнітного аналізатора (2.5.27).

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*Перша ідентифікація:* С.

*Друга ідентифікація:* А, В.

**А.** У конічну колбу, що містить випробовувану субстанцію, поміщають скіпу, що горить; скіпа продовжує горіти.

**В.** Використовують газову бюретку (Рисунок 1238.-2) із камерою об'ємом 25 мл, що у середній частині являє собою градуйовану трубку із кроком 0.2 % між 19.0 % та 23.0 % та відокремлена на кожному кінці краном із конічною втулкою. Нижній кран приєднаний до трубки із оливоподібною насадкою та використовується для надходження газу до апарата. Циліндричну лійку, розташовану вище верхнього крана, використовують для подавання розчину абсорбенту. Бюретку промивають водою  $P$  і висушують. Відкривають 2 крани. Приєднують насадку до джерела випробовуваного газу та пропускають газ зі швидкістю 1 л/хв. Продувають бюретку пропусканням через неї випробовуваного газу протягом 1 хв. Закривають нижній кран бюретки та відразу верхній кран. Швидко від'єднують бюретку від потоку випробовуваного газу. Швидко наполовину повертають верхній кран для усунення надлишкового тиску у бюретці. Тримають бюретку вертикально, наповнюють лійку свіжоприготованою сумішшю 21 мл розчину 560 г/л калію гідроксиду  $P$  та 130 мл розчину 200 г/л натрію дитіоніту  $P$ . Повільно відкривають верхній кран. Розчин абсорбує кисень і потрапляє у бюретку. Витримують протягом 10 хв без струшування. Відмічають рівень меніска рідини по градуйованій частині бюретки. Це значення показує вміст кисню у відсотках (об/об). Значення має знаходитися в інтервалі від 20.4 до 21.4.

**С.** Субстанція має відповідати вимогам, зазначеним у розділі «Кількісне визначення».

## ВИПРОБУВАННЯ

**Вуглецю діоксид.** Не більше 0.05 % (500 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням індикаторної трубки для вуглецю діоксиду (2.1.6).

**Сірки діоксид.** Не більше 0.0001 % (1 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням індикаторної трубки для сірки діоксиду (2.1.6).

**Масло.** Не більше 0.1 мг/м<sup>3</sup>, якщо для виробництва використовують масляний компресор. Визначення проводять із використанням індикаторної трубки для масла (2.1.6).

Азоту оксид і азоту діоксид. Не більше 0.0002 % (2 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням індикаторної трубки для азоту оксиду та азоту діоксиду (2.1.6).

Вуглецю оксид. Не більше 0.0005 % (5 ppm) (об/об), визначення проводять із використанням індикаторної трубки для вуглецю оксиду (2.1.6).

Води пара. Не більше 0.0067 % (67 ppm) (об/об). Визначення проводять із використанням індикаторної трубки для води пари (2.1.6). За дозволом компетентного уповноваженого органу для медичного повітря, одержаного на місці використання, та яке подається по системі із тиском не більше 10 бар і температурі не менше 5 °С, можуть бути застосовні такі межі: не більше 0.0870 % (870 ppm) (об/об); визначення проводять із використанням індикаторної трубки для води пари (2.1.6).

### ЗБЕРІГАННЯ

Як газ у підходящих контейнерах відповідно до встановлених правових норм або як газ, що подається по трубопроводу.

### МАРКУВАННЯ

Якщо необхідно, зазначають метод виробництва щодо використання масляного компресора.

### ДОМІШКИ

- A. CO<sub>2</sub>: вуглецю діоксид,
- B. SO<sub>2</sub>: сірки діоксид,
- C. NO: азоту оксид,
- D. NO<sub>2</sub>: азоту діоксид,
- E. масло,
- F. CO: вуглецю оксид,
- G. H<sub>2</sub>O: вода.

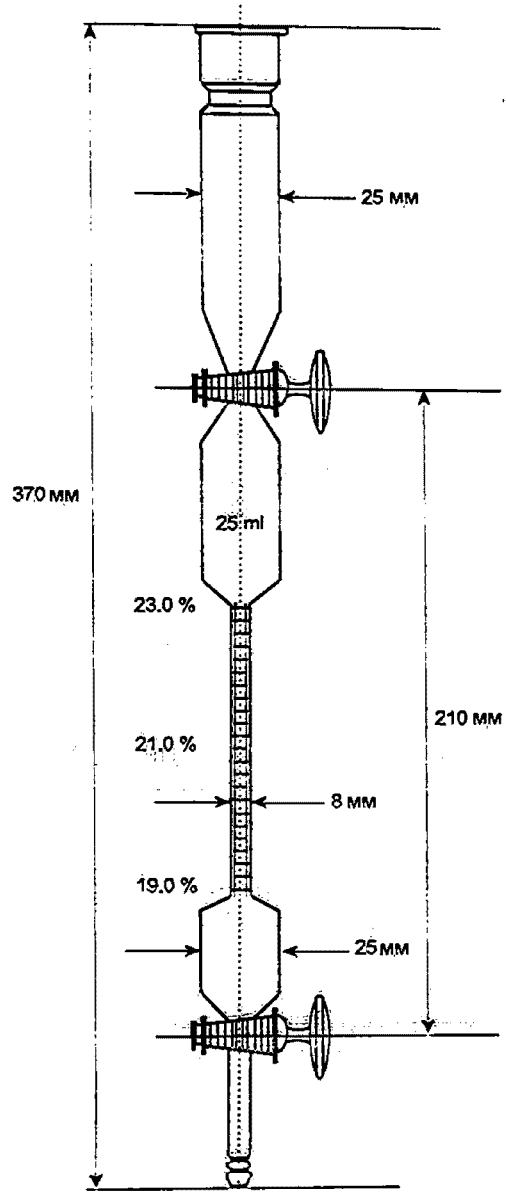


Рисунок 1238.-2. Газова бюретка

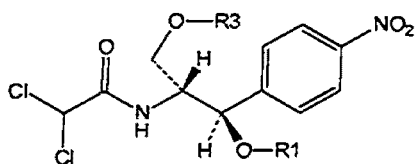


## X

ХЛОРАМФЕНІКОЛ НАТРІЮ  
СУКЦИНАТ

## Chloramphenicoli natrii succinas

## CLORAMPHENICOL SODIUM SUCCINATE



1 ізомер: R1 = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Na, R3 = H  
3 ізомер: R1 = H, R3 = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Na

C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub>

М.м. 445.2

Суміш у змінних пропорціях натрію (2*R*,3*R*)-2-[(дихлорацетил)аміно]-3-гідрокси-3-(4-нітрофеніл)пропіл бутандіоату (3 ізомер) і натрію (1*R*,2*R*)-2-[(дихлорацетил)аміно]-3-гідрокси-1-(4-нітрофеніл)пропіл бутандіоату (1 ізомер).

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

*Вміст*: від 98.0 % до 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис*. Порошок білого або жовтаво-білого кольору. Гігроскопічний.

*Розчинність*. Дуже легко розчинний у воді *P*, легко розчинний у 96 % спирті *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*A*. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин*. 20 мг субстанції розчиняють у 2 мл ацетону *P*.

*Розчин порівняння (а)*. 20 мг ФСЗ хлорамфеніколу натрію сукцинату розчиняють у 2 мл ацетону *P*.

*Розчин порівняння (б)*. 20 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у 2 мл ацетону *P*.

*Пластинка*: ТШХ пластинка із шаром силікагелю GF<sub>254</sub> *P*.

*Рухома фаза*: кислота оцтова розведена *P* - метанол *P* - хлороформ *P* (1:14:85).

*Об'єм проби, що наноситься*: 2 мкл.

*Відстань, що має пройти рухома фаза*: 15 см від лінії старту.

*Висушування*: на повітрі.

*Виявлення*: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 основні плями на рівні 2 основних плям на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідні їм за розміром; їх розташування має відрізнятися від розташування основної плями на хроматограмі розчину порівняння (б).

*B*. Близько 10 мг субстанції розчиняють в 1 мл спирту (50 % об/об), додають 3 мл розчину 10 г/л кальцію хлориду *P* і 50 мг цинку порошку *P* і нагрівають на водяній бані протягом 10 хв. Гарячий розчин фільтрують, охолоджують, додають 0.1 мл бензоїлхлориду *P*, струшують протягом 1 хв, додають 0.5 мл розчину заліза (III) хлориду *P* і 2 мл хлороформу *P* і струшують; верхній шар набуває світло-фіолетово-червоного або пурпурового забарвлення.

*C*. 50 мг субстанції розчиняють в 1 мл піридину *P*, додають 0.5 мл розчину натрію гідроксиду розведеного *P* і 1.5 мл води *P* і нагрівають у водяній бані протягом 3 хв; з'являється червоне забарвлення. До одержаного розчину додають 2 мл кислоти азотної *P*, охолоджують під проточною водою, додають 1 мл 0.1 *M* розчину срібла нітрату; поступово утворюється білий осад.

*D*. Субстанція дає реакцію (а) на натрій (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

*pH* (2.2.3). Від 6.4 до 7.0.

2.50 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Питоме оптичне обертання* (2.2.7). Від +5.0° до +8.0°, у перерахунку на безводну речовину.

0.50 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

## Хлорамфенікол натрію сукцинат

Хлорамфенікол і хлорамфенікол динатрію дисукцинат. Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 25.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 10.0 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл (розчин А). 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 10.0 мг ФСЗ хлорамфеніколу динатрію дисукцинату розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл (розчин В). 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння (с).* 25 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі, додають 5 мл розчину А та 5 мл розчину В і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

*Рухома фаза:* розчин 20 г/л кислоти фосфорної Р - метанол Р - вода Р (5:40:55).

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 275 нм.

*Об'єм інжекції:* 20 мкл.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (с):

— 2 відповідних піки на хроматограмах розчинів порівняння (а) і (б) мають бути чітко розділені із 2 основними піками на хроматограмі випро-

бовуваного розчину; якщо необхідно, коригують вміст метанолу в рухомій фазі.

*Нормування:*

— *хлорамфенікол:* площа піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівня (а) (2.0 %);

— *хлорамфенікол динатрію дисукцинат:* площа піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівня (б) (2.0 %).

*Вода (2.5.12).* Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 0.500 г субстанції.

*Пірогени (2.6.8).* Якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення пірогенів, вона має витримувати випробування на пірогени. Вводять на 1 кг маси кролика 2.5 мл розчину, що містить 2 мг субстанції в 1 мл води для ін'єкцій Р.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.200 г субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл. Вимірюють оптичну густину (2.2.25) одержаного розчину в максимумі за довжини хвилі 276 нм.

Вміст  $C_{15}H_{15}Cl_2N_2NaO_8$  обчислюють, використовуючи питомий показник поглинання, що дорівнює 220.

### ЗБЕРІГАННЯ

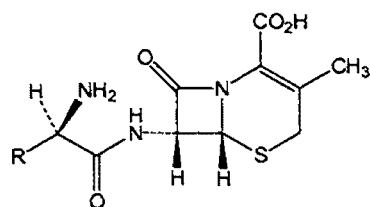
У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці. Якщо субстанція стерильна, її зберігають у стерильному повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття.

## Ц

## ЦЕФРАДИН

## Cefradinum

## CEFRADINE



Компонент	R	Молекулярна формула	М.м.
цефрадин		C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	349.4
цефалексин		C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	347.4
4',5'-дигідроцефрадин		C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	351.4

Цефрадин: [38821-53-3]

*Основний компонент:* (6*R*,7*R*)-7[[*(2R)*-аміно(циклогекса-1,4-дієніл)ацетил]аміно]-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-єн-2-карбонова кислота (цефрадин).

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

*Вміст:*

- *цефрадин:* не менше 90.0 %, у перерахунку на безводну речовину;
- *цефалексин:* не більше 5.0 %, у перерахунку на безводну речовину;
- *4',5'-дигідроцефрадин:* не більше 2.0 %, у перерахунку на безводну речовину;
- *сумарний вміст цефрадину, цефалексину та 4',5'-дигідроцефрадину, у відсотках:* від 96.0 % до 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Порошок білого або жовтавого кольору. Гігроскопічний.

**Розчинність.** Помірно розчинний у воді *P*, практично не розчинний у 96 % спирті *P* і гексані *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ цефрадину.

У разі різниці спектрів для зазначених речовин у твердому стані, 30 мг субстанції та 30 мг ФСЗ *цефрадину* окремо розчиняють у 10 мл *метанолу P*, упарюють насухо при температурі 40 °С і тиску менше 2 кПа та знову записують спектри одержаних залишків.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Розчин S.** 2.50 г субстанції розчиняють у *розчині натрію карбонату P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

**Прозорість розчину (2.2.1).** Розчин S за ступенем каламутності не має перевищувати еталон II.

**Кольоровість розчину.** Оптична густина (2.2.25) розчину S, виміряна через 5 хв після приготування за довжини хвилі 450 нм не має перевищувати 0.60.

**pH (2.2.3).** Від 3.5 до 6.0.

0.100 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Питоме оптичне обергання (2.2.7).** від +80.0° до +90.0°, у перерахунку на безводну речовину.

0.250 г субстанції розчиняють в *ацетатному буферному розчині pH 4.6 P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* 0.300 г субстанції розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

*Розчин порівняння (а).* 3.0 мг ФСЗ *циклогекса-1,4-дієнілгіцину P* (домішка В) розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл.



## Цефрадин

**Розчин порівняння (b).** 3 мг субстанції та 3 мг ФСЗ цефалексину розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 25 мл.

**Розчин порівняння (c).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (d).** 6 мг ФСЗ цефрадину для ідентифікації піків (містить домішки С, D і E) розчиняють в 1 мл рухомої фази А.

**Розчин порівняння (e).** Вміст віали ФСЗ цефрадину суміші домішок (домішки А та G) розчиняють в 1.0 мл рухомої фази А.

**Колонка:**

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 30 °С.

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: розчин 2.72 г/л калію дигідрофосфату Р, рН якого доведено до 3.0 кислотою фосфорною розведеною Р;

— рухома фаза В: метанол Р2.

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 2.5	99.5 → 97	0.5 → 3
2.5 - 11	97 → 75	3 → 25
11 - 13	75 → 60	25 → 40
13 - 16	60	40
16 - 19	60 → 20	40 → 80
19 - 19.1	20 → 99.5	80 → 0.5
19.1 - 25	99.5	0.5

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

**Об'єм інжекції:** 25 мкл.

**Ідентифікація домішок:** використовують хроматограму, що надається до ФСЗ цефрадину для ідентифікації піків і хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації піків домішок С, D і E. Використовують хроматограму, що надається до ФСЗ цефрадину суміші домішок та хроматограму розчину порівняння (e) для ідентифікації піків домішок А і G.

**Відносні часи утримування** до цефрадину (час утримування цефрадину близько 15 хв): домішки А — близько 0.27, домішки В — близько 0.32, домішки С — близько 0.53, домішки D — близько 0.63, домішки E — близько 0.80, домішки F — близько 0.92, цефалексину — близько 0.95, 4',5'-дигідроцефрадину — близько 1.06, домішки G — близько 1.32.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— коефіцієнт розділення: не менше 4.0 для піків цефалексину та цефрадину.

**Нормування:**

— домішка В: площа піка має становити не більше 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.25 %);

— домішки А, С, D, E, F, G: площа піка кожної домішки має становити не більше 0.25 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.25 %);

— будь-яка інша домішка: площа піка кожної домішки має становити не більше 0.25 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.25 %);

— сума домішок: сума площ піків має становити не більше 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (2.0 %);

— не враховують: піки, площа яких становить 0.05 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.05 %); не враховують піки цефалексину та 4',5'-дигідроцефрадину.

**N,N-Диметиланілін (2.4.26, метод В).** Не більше 0.002 % (20 ppm).

**Вода (2.5.12).** Не більше 6.0 %. Визначення проводять із 0.300 г субстанції.

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

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** 50.0 мг субстанції розчиняють у фосфатному буферному розчині рН 5.0 Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчин порівняння (a).** 50.0 мг ФСЗ цефрадину (містить 4',5'-дигідроцефрадин) розчиняють у фосфатному буферному розчині рН 5.0 Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 5.0 мг ФСЗ цефалексину розчиняють у фосфатному буферному розчині рН 5.0 Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

**Розчин порівняння (c).** 1 мл розчину порівняння (a) доводять фосфатним буферним розчином рН 5.0 Р до об'єму 10 мл. 5 мл одержаного розчину змішують із 5 мл розчину порівняння (b).

**Колонка:**

— розмір: 0.10 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:** метанол Р - фосфатний буферний розчин рН 5.0 Р (25:75).

**Швидкість рухомої фази:** 1.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

Об'єм інжекції: 5 мл.

Час хроматографування: у 2 рази більше часу утримування цефрадину.

Відносні часи утримування до цефрадину (час утримування цефрадину близько 3 хв): цефалексину — близько 0.7; 4',5'-дигідроцефрадину — близько 1.5.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

— коефіцієнт розділення: не менше 4.0 для піків цефалексину та цефрадину.

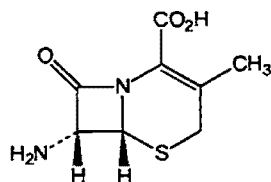
Вміст цефрадину, у відсотках, обчислюють, використовуючи хроматограму розчину порівняння (а) та заявлений вміст цефрадину у ФСЗ цефрадину. Вміст цефалексину, у відсотках, обчислюють, використовуючи хроматограму розчину порівняння (б) та заявлений вміст цефалексину у ФСЗ цефалексину. Вміст 4',5'-дигідроцефрадину, у відсотках, обчислюють, використовуючи хроматограму розчину порівняння (б) та множенням площі піка 4',5'-дигідроцефрадину на коригувальний коефіцієнт, що дорівнює 1.6.

## ЗБЕРІГАННЯ

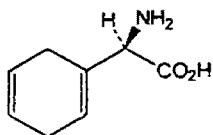
У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі від 2 °С до 8 °С.

## ДОМІШКИ

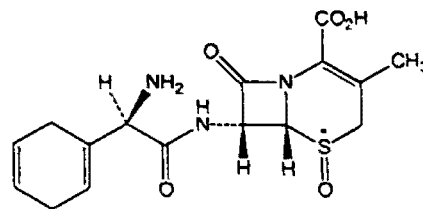
Специфіковані домішки: А, В, С, D, Е, F, G.



А. (6*R*,7*R*)-7-аміно-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло-[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота (7-амінодеацетоксицефалоспоринова кислота, 7-ADCA).

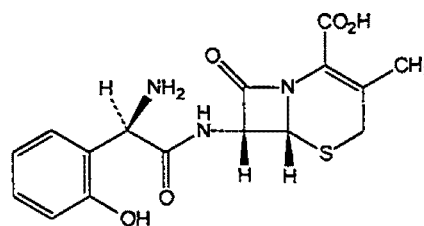


В. (2*R*)-аміно(циклогексан-1,4-дієніл)оцтова кислота (D-дигідрофенілгліцин, циклогексан-1,4-дієнілгліцин).

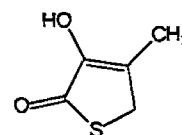


С. (6*R*,7*R*)-7-[[*(2R)*-аміно(циклогексан-1,4-дієніл)ацетил]аміно]-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонової кислоти 5-оксид (ізомер 1).

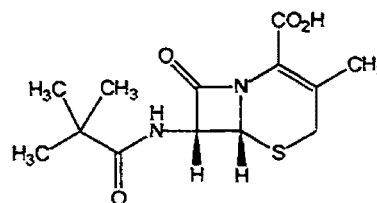
Д. (6*R*,7*R*)-7-[[*(2R)*-аміно(циклогексан-1,4-дієніл)ацетил]аміно]-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонової кислоти 5-оксид (ізомер 2).



Е. ((6*R*,7*R*)-7-[[*(2R)*-аміно(2-гідроксифеніл)ацетил]аміно]-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонової кислоти).



F. 3-гідрокси-4-метилтіофен-2(5*H*)он.



Г. (6*R*,7*R*)-7-[(2,2-диметилпропанойл)аміно]-3-метил-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонової кислоти (7-ADCA піваламід).



# **МОНОГРАФІЇ НА ГОТОВІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ**



## АМБРОКСОЛУ ТАБЛЕТКИ

## Ambroxoli tabulettae

## AMBROXOL TABLETS

Амброксолу таблетки містять амброксолу гідрохлорид.

Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.

Вміст амброксолу гідрохлориду ( $C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$ ) в таблетці. Не менше 92.5 % і не більше 107.5 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

**В.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.25 г амброксолу гідрохлориду, додають 20 мл метанолу Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл, фільтрують.

Приготування розчину порівняння, рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація С» монографії Амброксолу гідрохлорид.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**С.** До наважки порошку таблеток, еквівалентної 25 мг амброксолу гідрохлориду, додають 10 мл води Р, 1.0 мл розчину аміаку розведеного до 100, струшують протягом 2 хв, відстоюють протягом 5 хв, фільтрують і підкислюють кислотою до рН 2.0, введеною Р. Одержаний розчин дає реакцію на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення** (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, 900 мл.

*Обладнання:* прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

*Дозована одиниця:* необхідна кількість таблеток для забезпечення у посудині для розчинення сумарного вмісту амброксолу гідрохлориду 60 мг.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Використовують фільтрат.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ амброксолу гідрохлориду у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією амброксолу гідрохлориду, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 307 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$ .

**Однорідність дозованих одиниць** (2.9.40). Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 60 мг амброксолу гідрохлориду, додають 20 мл рухомої фази, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл, фільтрують.

*Розчин порівняння (а).* 60 мг ФСЗ амброксолу гідрохлориду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл. 4.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 20.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 5 мг ФСЗ амброксолу гідрохлориду розчиняють у 0.2 мл метанолу Р, додають 0.04 мл суміші розчин формальдегіду Р - вода Р (1:99), нагрівають при температурі 60 °С протягом 5 хв та випарюють насухо у потоці азоту. Одержаний залишок розчиняють у 5 мл води Р і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

*Формат:*

*Розмір:* 0.25 м × 4.6 мм;

*Рухома фаза:* силікагель октадецилсильний для хроматографії Р (5 мкм);

*Температура:* 30 °С.



**Амітриптиліну таблетки, вкриті оболонкою**

**Рухома фаза:** ацетонітрил *P* – розчин 2 г/л кислоти трихлороцтової *P* (26.5:73.5).

**Швидкість рухомої фази:** 1 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 244 нм.

**Інжекції:** 10 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

**Час хроматографування:** у 4 рази більше часу утримування основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину.

**Час утримування амброксолу:** від 9 хв до 12 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (б):

— **коефіцієнт розділення:** не менше 2.0 для піків амброксолу та домішки В.

**Нормування:**

— **будь-яка домішка:** на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного та піків з часом утримування до 4 хв, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.2 %);

— **сума домішок:** на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 2.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.5 %).

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).**

**Випробовуваний розчин.** До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 30 мг амброксолу гідрохлориду, додають 60 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, фільтрують. 10.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння.** 30.0 мг ФСЗ амброксолу гідрохлориду розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 307 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$  у ФСЗ амброксолу гідрохлориду.

**АМІТРИПТИЛІНУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ****Amitriptylini tabulettae obductae****AMITRIPTYLINE TABLETS COATED**

Амітриптиліну таблетки, вкриті оболонкою, містять амітриптиліну гідрохлорид.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст амітриптиліну гідрохлориду ( $C_{20}H_{24}ClN$ ) в таблетці.** Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ\***

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** До наважки порошку таблеток, еквівалентної близько 10 мг амітриптиліну гідрохлориду, додають 50 мл метанолу *P*, інтенсивно струшують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, перемішують і фільтрують порцію одержаного розчину. 10.0 мл одержаного фільтрату доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння.** 10 мг ФСЗ амітриптиліну гідрохлориду або USP Amitriptyline Hydrochloride RS розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** Метанол *P*.

**Спектральна область:** від 230 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Розчинення\*** (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Середовище розчинення:** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, 900 мл.

**Обладнання:** прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

**Випробовуваний розчин.** Використовують фільтрат або готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з підходящою концентрацією амітриптиліну гідрохлориду, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння.** Готують розчин порівняння ФСЗ амітриптиліну гідрохлориду або USP Amitriptyline Hydrochloride RS у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією амітриптиліну гідрохлориду, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

**Компенсаційний розчин.** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 239 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{20}H_{24}ClN$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробування проводять у захищеному від світла місці.**

**Випробовуваний розчин.** Наважку порошку таблеток (якщо необхідно, попередньо звільнених від оболонки), еквівалентну 50 мг амітриптиліну гідрохлориду, інтенсивно струшують з 10 мл хлороформу Р, відстоюють і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

**Розчин порівняння (а).** 12.5 мг ФСЗ дибензосуберону розчиняють у хлороформі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. 1 мл одержаного розчину доводять хлороформом Р до об'єму 100 мл.

**Розчин порівняння (б).** 10 мг ФСЗ циклобензаприну гідрохлориду розчиняють у хлороформі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. 1 мл одержаного розчину доводять хлороформом Р до об'єму 100 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю G Р.

**Рухома фаза:** діетиламін Р - етилацетат Р - циклогексан Р (3:15:85).

**Проби, що наносяться:** 20 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:** 14 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 10 хв.

Після висушування пластинку повторно хроматографують у тих самих умовах.

**Виявлення:** пластинку обприскують свіжоприготованою сумішшю розчин формальдегіду Р - кислота сірчана Р (4:96), нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 10 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

**Нормування:**

— **дибензосуберон:** на хроматограмі випробовуваного розчину пляма, відповідна дибензосуберону, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.25 %);

— **циклобензаприну гідрохлорид:** на хроматограмі випробовуваного розчину пляма, відповідна циклобензаприну гідрохлориду, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.2 %);

— **інші домішки:** на хроматограмі випробовуваного розчину допускається наявність двох додаткових плям, кожна з яких не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.2 %).

**Допускається наявність плями на лінії старту.**

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ\*

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** До 20 таблеток додають 250 мл рухомої фази, струшують протягом 1 год або до повного розпадання таблеток, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл, перемішують і фільтрують. Розводять аліквоту фільтрату рухомою фазою до одержання розчину з концентрацією близько 0.2 мг/мл амітриптиліну гідрохлориду.

**Розчин порівняння.** Точну наважку ФСЗ амітриптиліну гідрохлориду або USP Amitriptyline Hydrochloride RS розчиняють у рухомій фазі, розводять аліквоту одержаного розчину рухомою фазою до концентрації близько 0.2 мг/мл амітриптиліну гідрохлориду.

**Колонка:**

— **розмір:** 0.3 м × 4.0 мм;

— **нерухома фаза:** силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р.

**Рухома фаза:** ацетонітрил Р - фосфатний буферний розчин, приготований таким чином: 11.04 г натрію дигідрофосфату моногідрату Р розчиняють у 900 мл води Р, додають кислоту фосфорну концентровану Р до рН 2.5±0.5, доводять об'єм розчину водою Р до 1000 мл і перемішують (42:58). При необхідності коригують.

**Швидкість рухомої фази:** 2.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння:



**Амоксициліну капсули**

- коефіцієнт симетрії: не більше 2.0;
- ефективність колонки: не менше 800 теоретичних тарілок;
- збіжність: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{20}H_{24}ClN$  в одній таблетці, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{20}H_{24}ClN$  у ФСЗ амітриптиліну гідрохлориду або USP Amitriptyline Hydrochloride RS.

\* Використані матеріали монографії Amitriptyline Hydrochloride Tablets Фармакопеї США

**АМОКСИЦИЛІНУ КАПСУЛИ****Amoxicillini capsulae****AMOXICILLIN CAPSULES**

Амоксициліну капсули містять амоксициліну тригідрат.

Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.

Вміст амоксициліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ ) в капсулі. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. Наважку вмісту капсул, еквівалентну 0.25 г амоксициліну, розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (а) і (б), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії Амоксициліну тригідрат.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):

- на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**ВИПРОБУВАННЯ**

Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

Середовище розчинення: вода Р, 900 мл.

Обладнання: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв (для капсул, що містять 250 мг амоксициліну).

Обладнання: прилад 2, швидкість обертання 75 об/хв (для капсул, що містять 500 мг амоксициліну).

Час розчинення: 60 хв.

Випробовуваний розчин. Готують розведенням аліквоти фільтрату водою Р до одержання розчину з концентрацією близько 30 мкг/мл амоксициліну, розрахованою відносно номінального вмісту.

Розчин порівняння. Готують розчин порівняння ФСЗ амоксициліну тригідрату або USP Amoxicillin RS у воді Р з концентрацією амоксициліну, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

Компенсаційний розчин. Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 272 нм відносно компенсаційного розчину.

Нормування: не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ .

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Витримують вимоги.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Буферний розчин рН 5.0. До 250 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату додають розчин натрію гідроксиду розведений Р до рН 5.0 і доводять об'єм розчину водою Р до 1000.0 мл.

Випробовуваний розчин. До наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.15 г амоксициліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом 1 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, перемішують і фільтрують. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (а). 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння (б). 4.0 мг ФСЗ цефадроксилу і 30.0 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

Колонка:

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

Рухома фаза:

- рухома фаза А: ацетонітрил Р - буферний розчин рН 5.0 (1:99);
- рухома фаза В: ацетонітрил Р - буферний розчин рН 5.0 (20:80).

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	92	8
$t_R - (t_R + 25)$	92 → 0	8 → 100
$(t_R + 25) - (t_R + 40)$	0	100
$(t_R + 40) - (t_R + 55)$	92	8

$t_R$  — час утримування амоксициліну на хроматограмі розчину порівняння (а)

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

Інжекції: 50 мкл; вводять розчин порівняння (а) і розчин порівняння (б) в ізократичному режимі при вихідному складі рухомої фази, випробовуваний розчин у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків амоксициліну та цефадроксилу; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

Нормування:

— будь-яка домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (1 %).

Вода (2.5.12). Не більше 14.5 %. Визначення проводять із 0.1 г вмісту капсул.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки», з такими змінами:

Випробовуваний розчин. До точної наважки вмісту капсул, еквівалентної 60 мг амоксициліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом 1 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

Розчин порівняння (с). 35.0 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

Інжекції: 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (б), (с).

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

— збіжність: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту

капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  у ФСЗ амоксициліну тригідрату.

\* Використані матеріали монографії *Amoxicillin Capsules Фармакопеї США*

## АМОКСИЦИЛІНУ ПОРОШОК ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Amoxicillinum pro injectionibus

#### AMOXICILLIN FOR INJECTION

Амоксициліну порошок для ін'єкцій є стерильним порошком амоксициліну натрію, вміщений у герметично закупорений контейнер.

Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та додатково підрозділу «Порошки для приготування ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів» та наведеним нижче вимогам.

Вміст амоксициліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ ) в контейнері. Не менше 90.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Підготовка зразка: наважку вмісту контейнера, еквівалентну 0.25 г амоксициліну, розчиняють у 5 мл води Р, додають 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, перемішують, витримують у льодяній бані протягом 10 хв і фільтрують. Одержаний осад промивають 2-3 мл суміші вода Р - ацетон Р (1:9) і сушать при температурі 60 °С протягом 30 хв.

Відповідність: спектру ФСЗ амоксициліну тригідрату.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Визначають масу вмісту 10 контейнерів (2.9.5) і змішують вміст цих 10 контейнерів.

Випробовуваний розчин. Наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, еквівалентну 0.25 г амоксициліну, розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл.

Приготування розчинів порівняння (а) і (б), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у

випробуванні «Ідентифікація В» монографії Амоксицилін натрію.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

С. Препарат дає реакцію (a) на натрій (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 1.0 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл. Розчин випробовують відразу після приготування. Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон ІІ.

**Кольоровість розчину.** Розчин, приготований для випробування «Прозорість розчину», відразу після приготування має рожеве забарвлення, що швидко зникає. Оптична густина (2.2.25) розчину, виміряна через 5 хв після приготування за довжини хвилі 430 нм, не має перевищувати 0.20.

**pH (2.2.3).** Від 8.0 до 10.0. 2.0 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримує вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** До наважки змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентної 0.15 г амоксициліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом 1 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

**Розчин порівняння (a).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** До 0.2 г ФСЗ амоксициліну тригідрату додають 1 мл води Р, струшують і додають краплями розчин натрію гідроксиду розведений Р до одержання розчину. pH одержаного розчину має бути близько 8.5. Розчин витримують при кімнатній температурі протягом 4 год. 0.5 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (c).** 4.0 мг ФСЗ цефадроксилу і 30.0 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: ацетонітрил Р - розчин 25 % (об/об) 0.2 М розчину калію дигідрофосфату, pH якого попередньо доводять до 5.0 розчином натрію гідроксиду розведеним Р, (1:99);

— рухома фаза В: ацетонітрил Р - розчин 25 % (об/об) 0.2 М розчину калію дигідрофосфату, pH якого попередньо доводять до 5.0 розчином натрію гідроксиду розведеним Р, (20:80).

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	92	8
$t_R - (t_R + 25)$	92 → 0	8 → 100
$(t_R + 25) - (t_R + 40)$	0	100
$(t_R + 40) - (t_R + 55)$	92	8

$t_R$  — час утримування амоксициліну на хроматограмі розчину порівняння (a)

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 50 мкл; вводять розчин порівняння (a) і розчин порівняння (c) в ізократичному режимі при вихідному складі рухомої фази, випробовуваний розчин і розчин порівняння (b) у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

**Ідентифікація домішок:** розчин порівняння (b): три основних піки, що елюються після основного піка, і що відповідають дикетопіперазину амоксициліну, димеру амоксициліну і тримеру амоксициліну.

**Відносні часи утримування до амоксициліну:** дикетопіперазину амоксициліну — близько 3.4; димеру амоксициліну — близько 4.1; тримеру амоксициліну — близько 4.5.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (c):

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків амоксициліну та цефадроксилу; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

**Нормування:**

— димер амоксициліну: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідного димеру амоксициліну, не має перевищувати 3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (3 %);

- *будь-яка домішка*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (2 %);
- *сума домішок*: сума площ усіх піків не має перевищувати 9 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (9 %);
- *не враховують*: піки, площа яких менше 0.1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.1 %).

**Вода (2.5.12)**. Не більше 4.0 %. Визначення проводять із 0.3 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В».

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14)**. Менше 0.25 МО/мг амоксициліну.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29)**.

*Випробовуваний розчин*. До точної наважки змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентної 60.0 мг амоксициліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом 1 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (b) і (c) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Амоксициліну капсули*.

*Інжекції*: 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (c).

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (c):

— *збіжність*: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  в одному контейнері, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту контейнера, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  у ФСЗ амоксициліну тригідрату.

## АМОКСИЦИЛІНУ ПОРОШОК ДЛЯ ОРАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ

*Amoxicillinum pro suspensionis peroralia*

### AMOXICILLIN FOR ORAL SUSPENSION

Амоксициліну порошок для оральної суспензії є сухою сумішшю амоксициліну тригідрату та однієї або більше допоміжних речовин.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» і додатково підрозділу «Порошки і гранули для приготування оральних розчинів і суспензій» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст амоксициліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ )**. Не менше 90.0 % і не більше 120.0 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**Тонкошарова хроматографія (2.2.27)**.

*Випробовуваний розчин*. Точно виміряний об'єм свіжоприготованої суспензії розводять розчином натрію гідрокарбонату Р до одержання концентрації 2.5 мг/мл амоксициліну, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (a) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії *Амоксициліну тригідрат*.

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

## ВИПРОБУВАННЯ

**рН (2.2.3)**. Від 4.0 до 7.5. Вимірюють рН суспензії, приготованої як зазначено на етикетці.

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40)**. Визначення проводять для однодозових контейнерів.

**Вода (2.5.12)**. Не більше 3.0 % Визначення проводять із 0.2 г сухої суміші.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29)**.

*Випробовуваний розчин*. Точно виміряний об'єм свіжоприготованої суспензії, еквівалентний 60 мг амоксициліну, доводять рухомою фазою А до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (b) і (c) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Амоксициліну капсули*.

*Інжекції*: 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (c).

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (c):

**Амоксициліну таблетки**

— *збіжність*: відповідно до вимог 2.2.46.

Повторюють визначення, використовуючи суспензію, що зберігалася протягом терміну придатності в умовах, зазначених на етикетці.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  в 1 мл суспензії, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  у ФСЗ амоксициліну тригідрату.

**АМОКСИЦИЛІНУ ТАБЛЕТКИ****Amoxicillini tabulettae****AMOXICILLIN TABLETS**

Амоксициліну таблетки містять амоксициліну тригідрат.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст амоксициліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ ) в таблетці.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.25 г амоксициліну, додають 80 мл розчину натрію гідрокарбонату Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (а) і (б), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії Амоксициліну тригідрат.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (б):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Розчинення (2.9.3).**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* вода Р, 800 мл.

*Обладнання:* прилад І, швидкість обертання 150 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату водою Р до одержання розчину з концентрацією близько 0.16 мг/мл амоксициліну, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ амоксициліну тригідрату у воді Р з концентрацією амоксициліну, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 272 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 75 мг амоксициліну, додають рухому фазу А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом 1 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 50.0 мл.

Приготування буферного розчину рН 5.0, розчинів порівняння (а) і (б), рухомі фази А і В, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії Амоксициліну капсули.

*Інжекції:* 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (б):

— *коефіцієнт розділення:* не менше 2.0 для піків амоксициліну та цефадроксилу; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

*Нормування:*

— *будь-яка домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (1 %).

**Вода (2.5.12).** Від 9.5 % до 13.0 %. Визначення проводять із 0.1 г порошку таблеток.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 60 мг амоксициліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, витримують в ультразвуковій бані протягом

1 хв. доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (b) і (c) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Амоксициліну капсули*.

*Інжекції*: 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (c).

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (c):

— *збіжність*: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  у ФСЗ амоксициліну тригідрату.

## АМПІЦИЛІНУ КАПСУЛИ

### Ampicillini capsulae

#### AMPICILLIN CAPSULES

Ампіциліну капсули містять ампіциліну тригідрат.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст ампіциліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ ) в капсулі.** Не менше 92.5 % і не більше 107.5 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Наважку вмісту капсул, еквівалентну 0.25 г ампіциліну, розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (a) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії *Ампіциліну тригідрат*.

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**В.** Наважку вмісту капсул, еквівалентну 20 мг ампіциліну, поміщають у пробірку, струшують із 0.5 мл

води Р і 5 мл розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р; розчин має бути злегка жовтуватого кольору. Пробірку із сумішшю витримують у киплячій водяній бані протягом 1 хв; з'являється темно-жовте забарвлення.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення\*** (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення*: вода Р; 900 мл.

*Обладнання*: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

*Час розчинення*: 45 хв.

*Буферний розчин рН 5.2*. 464 мл розчину 21 г/л кислоти лимонної Р доводять розчином 71.63 г/л динатрію гідрофосфату Р до об'єму 1000 мл, та, якщо необхідно, доводять рН до 5.2.

*Буферний розчин міді(II) сульфату рН 5.2*. 15 мл розчину 3.93 г/л міді(II) сульфату Р доводять буферним розчином рН 5.2 до об'єму 1000.0 мл.

*Випробовуваний розчин (a)*. Готують розведенням аліквоти фільтрату буферним розчином міді(II) сульфату рН 5.2 до одержання розчину з концентрацією близько 25 мкг/мл ампіциліну, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Випробовуваний розчин (b)*. Точно виміряні 25.0 мл випробовуваного розчину (a) поміщають у щільно закупорену колбу з притертою шийкою, нагрівають у водяній бані при температурі  $(80 \pm 2)$  °С протягом 30 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури. *Розчин готують безпосередньо перед використанням.*

*Розчин порівняння (a)*. Готують розчин порівняння ФСЗ ампіциліну тригідрату або USP Ampicillin RS у воді Р з концентрацією ампіциліну, близькою до концентрації аліквоти фільтрату, потім розводять одержаний розчин буферним розчином міді(II) сульфату рН 5.2 до концентрації ампіциліну, близькою до концентрації випробовуваного розчину (a).

*Розчин порівняння (b)*. Точно виміряні 25.0 мл розчину порівняння (a) поміщають у щільно закупорену колбу з притертою шийкою, нагрівають у водяній бані при температурі  $(80 \pm 2)$  °С протягом 30 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури. *Розчин готують безпосередньо перед використанням.*

*Компенсаційний розчин*. Випробовуваний розчин (a).

Оптичну густину випробовуваного розчину (b) та розчину порівняння (b) вимірюють за довжини хвилі 320 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування*: не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ .

**Ампіциліну порошок для ін'єкцій**

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** До наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.3 г ампіциліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.4 мкм.

**Розчин порівняння (а).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (б).** 2.0 мг ФСЗ цефрадину і 25.0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 50 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000.0 мл;

— рухома фаза В: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 400 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000.0 мл.

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	85	15
$t_R - (t_R + 30)$	85 → 0	15 → 100
$(t_R + 30) - (t_R + 45)$	0	100
$(t_R + 45) - (t_R + 60)$	85	15

$t_R$  — час утримування ампіциліну на хроматограмі розчину порівняння (а)

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад використовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 50 мкл; вводять розчин порівняння (а) і розчин порівняння (б) в ізократичному режимі при вихідному складі рухомої фази, випробовуваний розчин у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (б):

— коефіцієнт розділення: не менше 3.0 для піків ампіциліну та цефрадину; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

**Нормування:**

— будь-яка домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (1 %).

**Вода (2.5.12).** Від 10.0 % до 15.0 %. Визначення проводять із 0.1 г вмісту капсул.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки», з такими змінами:

**Випробовуваний розчин.** До точної наважки вмісту капсул, еквівалентної 60 мг ампіциліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, фільтрують. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (с).** 60.0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

**Інжекції:** 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (б), (с).

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (с):

— збіжність: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  у ФСЗ ампіциліну безводного.

\* Використані матеріали монографії *Ampicillin Capsules Фармакопеї США*

**АМПІЦИЛІНУ ПОРОШОК ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ****Ampicillinum pro injectionibus****AMPICILLIN FOR INJECTION**

Ампіциліну порошок для ін'єкцій є стерильним порошком ампіциліну натрію, вміщений у герметично закупорений контейнер.

Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та до-

датково підрозділу «Порошки для приготування ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів» та наведеним нижче вимогам.

Вміст ампіциліну ( $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ ) в контейнері. Не менше 90.0 % і не більше 115.0 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Підготовка зразка:* наважку вмісту контейнера, еквівалентну 0.25 г ампіциліну, розчиняють у 5 мл води Р, додають 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, перемішують і витримують у льодяній бані протягом 10 хв, фільтрують крізь невеликий скляний фільтр (40) під вакуумом. Одержаний осад промивають 2-3 мл суміші вода Р - ацетон Р (1:9) і сушать при температурі 60 °С протягом 30 хв.

*Відповідність:* спектру ФСЗ ампіциліну тригідрату.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Визначають масу вмісту 10 контейнерів (2.9.5) і змішують вміст цих 10 контейнерів.

*Випробовуваний розчин.* Наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, еквівалентну 0.25 г ампіциліну, розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл.

Приготування розчинів порівняння (а) і (б), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії Ампіцилін натрію.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (б):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

С. Препарат дає реакцію (а) на натрій (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 1.0 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», поміщають у конічну колбу та повільно, при постійному перемішуванні, додають 10 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої (розчин А). 1.0 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», окремо розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл (розчин В). Розчини випробовують відразу після приготування. Розчини А і В за ступенем каламутності не мають перевищувати еталон ІІ.

**Кольоровість розчину.** Оптична густина (2.2.25). розчину В, приготованого для випробування «Прозорість розчину», виміряна відразу після приготування за довжини хвилі 430 нм, не має перевищувати 0.15.

**pH (2.2.3).** Від 8.0 до 10.0. 2.0 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл. Визначення проводять через 10 хв після приготування розчину.

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримує вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентної 0.3 г ампіциліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.4 мкм.

*Розчин порівняння (а).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* До 0.2 г ФСЗ ампіциліну безводного додають 1 мл води Р, нагрівають при температурі 60 °С протягом 1 год. 0.5 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (с).* 2.0 мг ФСЗ цефрадину і 25.0 мг ФСЗ ампіциліну безводного розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:*

— рухома фаза А: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 50 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000.0 мл;

— рухома фаза В: суміш 0.5 мл кислоти оцтової розведеної Р, 50 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату і 400 мл ацетонітрилу Р, доведена водою Р до об'єму 1000.0 мл.

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - $t_R$	85	15
$t_R - (t_R + 30)$	85 → 0	15 → 100
$(t_R + 30) - (t_R + 45)$	0	100
$(t_R + 45) - (t_R + 60)$	85	15

$t_R$  — час утримування ампіциліну на хроматограмі розчину порівняння (а)

Якщо склад рухомої фази було змінено для досягнення необхідного розділення, змінений склад ви-



**Ампіциліну порошок для оральної суспензії**

користовують за нульового часу у градієнті та кількісному визначенні.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

*Інжекції:* 50 мкл; вводять розчин порівняння (а) і розчин порівняння (с) в ізократичному режимі при вихідному складі рухомої фази, випробовуваний розчин і розчин порівняння (b) у градієнті; як контрольний дослід хроматографують рухому фазу А у градієнті.

*Відносні часи утримування* до ампіциліну на хроматограмі розчину порівняння (b): димеру ампіциліну — близько 2.8.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (с):

— *коефіцієнт розділення:* не менше 3.0 для піків ампіциліну та цефрадину; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

*Нормування:*

— *димер ампіциліну:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідного димеру ампіциліну, не має перевищувати 4.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (4.5 %);

— *будь-яка домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (2 %).

**Вода (2.5.12).** Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 0.3 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В».

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.15 МО/мг ампіциліну, якщо препарат застосовують у максимальній дозі 33.3 мг на кілограм маси тіла за годину або менше. Якщо препарат застосовують у максимальній дозі більше 33.3 мг на кілограм маси тіла за годину, граничний вміст розраховують, як зазначено у статті «Бактеріальні ендотоксини» (2.6.14).

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

*Випробовуваний розчин.* Точну наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентну 60.0 мг ампіциліну, розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

Приготування розчинів порівняння (b) і (с) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Ампіциліну капсули*.

*Інжекції:* 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (с).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (с):

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  в одному контейнері, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту контейнера, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  у ФСЗ ампіциліну безводного.

**АМПІЦИЛІНУ ПОРОШОК ДЛЯ  
ОРАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ****Ampicillinum pro suspensionis peroralia****AMPICILLIN FOR ORAL SUSPENSION**

Ампіциліну порошок для оральної суспензії є сухою сумішшю ампіциліну тригідрату та однієї або більше допоміжних речовин.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Рідкі лікарські засоби для орального застосування» і додатково підрозділу «Порошки і гранули для приготування оральних розчинів і суспензій» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст ампіциліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ ).** Не менше 90.0 % і не більше 120.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**Тонкошарова хроматографія (2.2.27).**

*Випробовуваний розчин.* Точно вимірний об'єм свіжоприготованої суспензії розводять *розчином натрію гідрокарбонату Р* до одержання концентрації 2.5 мг/мл ампіциліну, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (а) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії *Ампіциліну тригідрат*.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**рН (2.2.3).** Від 4.0 до 7.5. Вимірюють рН суспензії, приготованої як зазначено на етикетці.

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Визначення проводять для однодозових контейнерів.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 4.0 %. 0.500 г сухої суміші сушать при температурі 60 °С і тиску не більше 0.7 кПа протягом 3 год.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точно вимірний об'єм свіжоприготованої суспензії, еквівалентний 60 мг ампіциліну, доводять рухомою фазою А до 100.0 мл, фільтрують 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

Приготування розчинів порівняння (b) і (c) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Ампіциліну капсули*.

*Інжекції:* 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (c).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (c):

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Повторюють визначення, використовуючи суспензію, що зберігалася протягом терміну придатності в умовах, зазначених на етикетці.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  в 1 мл суспензії, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  у ФСЗ ампіциліну безводного.

## АМПІЦИЛІНУ ТАБЛЕТКИ

### Ampicillini tabulettae

#### AMPICILLIN TABLETS

Ампіциліну таблетки містять ампіциліну тригідрат.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст ампіциліну ( $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.25 г ампіциліну, розчиняють у розчині

*натрію гідрокарбонату Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, фільтрують.

Приготування розчинів порівняння (a) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація В» монографії *Ампіциліну тригідрат*.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (b):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

В. Наважку порошку таблеток, еквівалентну 20 мг ампіциліну, поміщають у пробірку, струшують із 0.5 мл *води Р* і 5 мл *розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р*; розчин має бути злегка жовтуватого кольору. Пробірку із сумішшю витримують у киплячій водяній бані протягом 1 хв; з'являється темно-жовте забарвлення.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення\*** (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* вода Р; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Буферний розчин рН 5.2.* 464 мл розчину 21 г/л *кислоти лимонної Р* доводять розчином 71.63 г/л *динатрію гідрофосфату Р* до об'єму 1000.0 мл, та, якщо необхідно, доводять рН до 5.2.

*Буферний розчин міді(II) сульфату рН 5.2.* 15 мл розчину 3.93 г/л *міді(II) сульфату Р* доводять буферним розчином рН 5.2 до об'єму 1000.0 мл.

*Випробовуваний розчин (a).* Готують розведенням аліквоти фільтрату буферним розчином міді(II) сульфату рН 5.2 до одержання розчину з концентрацією близько 25 мкг/мл ампіциліну, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Випробовуваний розчин (b).* Точно виміряні 25.0 мл випробовуваного розчину (a) поміщають у щільно закупорену колбу з притертою шийкою, нагрівають у водяній бані при температурі  $(80 \pm 2)$  °С протягом 30 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури. *Розчин готують безпосередньо перед використанням.*

*Розчин порівняння (a).* Готують розчин порівняння ФСЗ ампіциліну тригідрату або USP Ampicillin RS у воді Р з концентрацією ампіциліну, близькою до

## Бромгексину таблетки

концентрації аліквоти фільтрату, потім розводять одержаний розчин буферним розчином міді(II) сульфату рН 5.2 до концентрації ампіциліну, близькою до концентрації випробовуваного розчину (а).

*Розчин порівняння (b).* Точно виміряні 25.0 мл розчину порівняння (а) поміщають у щільно закупорену колбу з притертою шийкою, нагрівають у водяній бані при температурі  $(80 \pm 2)$  °С протягом 30 хв, швидко охолоджують до кімнатної температури. *Розчин готують безпосередньо перед використанням.*

*Компенсаційний розчин.* Випробовуваний розчин (а).

Оптичну густину випробовуваного розчину (b) та розчину порівняння (b) вимірюють за довжини хвилі 320 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ .

*Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).* Витримують вимоги.

*Супровідні домішки.* Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.3 г ампіциліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.4 мкм.

Приготування розчинів порівняння (а) і (b), рухомої фази А і В, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії *Ампіциліну капсули*.

*Інжекції:* 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (b).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (b):

— *коефіцієнт розділення:* не менше 3.0 для піків ампіциліну та цефрадину; якщо необхідно, коригують співвідношення рухомих фаз А:В.

*Нормування:*

— *будь-яка домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (1 %).

*Вода (2.5.12).* Від 9.0 % до 15.0 %. Визначення проводять із 0.1 г порошку таблеток.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

*Рідинна хроматографія (2.2.29).*

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 60 мг ампіциліну, додають 80 мл рухомої фази А, струшують протягом 15 хв, до-

водять об'єм розчину рухомою фазою А до 100.0 мл, фільтрують. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

Приготування розчинів порівняння (b) і (c) та умови хроматографування, як зазначено в розділі «Кількісне визначення» монографії *Ампіциліну капсули*.

*Інжекції:* 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (c).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (c):

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  у ФСЗ ампіциліну безводного.

\* Використані матеріали монографії *Ampicillin Tablets Фармакопії США*

## БРОМГЕКСИНУ ТАБЛЕТКИ

### Bromhexini tabulettae

#### BROMHEXINE TABLETS

Бромгексину таблетки містять бромгексину гідрохлорид.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст бромгексину гідрохлориду ( $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$ ) в таблетці.** Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* До 5 мл випробовуваного розчину (а), приготованого для кількісного визначення, додають 1 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять 96 % спиртом Р до об'єму 25.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Спектральна область:* від 220 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за довжин хвиль 250 нм і 318 нм.

В. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (c), відповідна їй за розміром та інтенсивністю поглинання.

С. До наважки порошку таблеток, еквівалентної 55 мг бромгексину гідрохлориду, додають 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, перемішують і фільтрують. Одержаний розчин дає реакцію (a) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

### Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

Середовище розчинення: 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

Обладнання: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

Дозована одиниця: необхідна кількість таблеток для забезпечення у посудині для розчинення сумарного вмісту бромгексину гідрохлориду 40 мг.

Випробовуваний розчин. Використовують фільтрат.

Розчин порівняння. 0.100 г ФСЗ бромгексину гідрохлориду розчиняють у 20 мл 96 % спирту Р, доводять об'єм розчину 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100.0 мл. 4.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 100.0 мл.

Компенсаційний розчин. 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 311 нм відносно компенсаційного розчину.

Нормування: не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$ .

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Витримують вимоги.

Супровідні домішки. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин (a). До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.2 г бромгексину гідрохлориду, додають 7 мл метанолу Р, струшують протягом 10 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл, фільтрують.

Випробовуваний розчин (b). 1 мл випробовуваного розчину (a) доводять метанолом Р до об'єму 10 мл.

Розчин порівняння (a). 0.5 мл випробовуваного розчину (b) доводять метанолом Р до об'єму 20 мл.

Розчин порівняння (b). 7.5 мл розчину порівняння (a) доводять метанолом Р до об'єму 10 мл.

Розчин порівняння (c). 20 мг ФСЗ бромгексину гідрохлориду розчиняють у метанолі Р, доводять об'єм розчину метанолом Р до 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р.

Рухома фаза: кислота оцтова безводна Р - вода Р - бутанол Р (17:17:66).

Проби, що наносяться: 20 мкл; випробовувані розчини (a), (b) і розчини порівняння (a), (b), (c).

Відстань, яку має пройти рухома фаза:  $\frac{3}{4}$  довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b):

— на хроматограмі чітко видна пляма.

Нормування:

— будь-яка домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину (a) будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.25 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

Випробовуваний розчин (a). До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 40 мг бромгексину гідрохлориду, додають 150 мл 96 % спирту Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200.0 мл, фільтрують.

Випробовуваний розчин (b). До 10.0 мл випробовуваного розчину (a) додають 1 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять 96 % спиртом Р до об'єму 25.0 мл.

Розчин порівняння. 40.0 мг ФСЗ бромгексину гідрохлориду розчиняють у 96 % спирті Р та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200.0 мл. До 10.0 мл одержаного розчину додають 1 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять 96 % спиртом Р до об'єму 25.0 мл.

Компенсаційний розчин. 1 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої доводять 96 % спиртом Р до об'єму 25.0 мл.

Оптичну густину випробовуваного розчину (b) та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 318 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунок на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$  у ФСЗ бромгексину гідрохлориду.

## ДИПІРИДАМОЛУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ

### Dipyridamoli tabulettae obductae

#### DIPYRIDAMOLE TABLETS COATED

Дипіридамолу таблетки, вкриті оболонкою, містять дипіридамол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст дипіридамолу ( $C_{24}H_{40}N_8O_4$ ) в таблетці. Не менше 92.5 % і не більше 107.5 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.\*** Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачерво-ній області (2.2.24).

*Підготовка зразка:* наважку порошку таблеток, еквівалентну близько 0.1 г дипіридамолу, струшують з 10 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої та фільтрують. До одержаного фільтрату додають 0.1 М розчин натрію гідроксиду до лужної реакції розчину і утворення осаду. Суміш нагрівають на водяній бані протягом 1 хв, охолоджують і фільтрують. Залишок сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год.

*Відповідність:* спектру ФСЗ дипіридамолу або USP Dipyridamole RS.

**B.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Спектральна область:* від 220 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення\*** (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 30 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з підходящою концентрацією дипіридамолу, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ дипіридамолу або USP Dipyridamole RS у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією дипіридамолу, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 282 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 70 % (Q) від номінального вмісту  $C_{24}H_{40}N_8O_4$ .

**Однорідність дозованих одиниць** (2.9.40). Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг дипіридамолу, додають 50 мл рухомої фази, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння (a).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 20.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 10.0 мг ФСЗ дилтіазему гідрохлориду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять розчином порівняння (a) до об'єму 20.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 30 °С.

*Рухома фаза:* 0.504 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у 370 мл води Р, додають кислоту фосфорну Р до рН 3.0, потім додають 80 мл ацетонітрилу Р та 550 мл метанолу Р.

*Швидкість рухомої фази:* 1.3 мл/хв.

*Детектування:* за довжини хвилі 290 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (a), (b).

*Час хроматографування:* у 9 разів більше часу утримання дипіридамолу.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b):

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків дилтіазему та дипіридамолу.

Нормування:

- *будь-яка домішка*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);
- *сума домішок*: на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (1.0 %);
- *не враховують*: піки, площа яких менше 0.1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.05 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин*. До 10 таблеток додають 300 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої, нагрівають, перемішуючи, при температурі 40 °С протягом 20 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл, перемішують і фільтрують. Фільтрат розводять, якщо необхідно, 1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з концентрацією 0.5 мг/мл дипіридамолу. 1.0 мл фільтрату або розчину з концентрацією 0.5 мг/мл дипіридамолу доводять водою Р до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння*. 50.0 мг ФСЗ дипіридамолу розчиняють у 1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 50.0 мл.

*Компенсаційний розчин*. 1.0 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої доводять водою Р до об'єму 50.0 мл.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 283 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{24}H_{40}N_8O_4$  в одній таблетці, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{24}H_{40}N_8O_4$  у ФСЗ дипіридамолу.

\* Використані матеріали монографії *Dipyridamol Tablets Фармакопеї США*

## ІБУПРОФЕНУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ

### Ibuprofeni tabulettae obductae

#### IBUPROFEN TABLETS COATED

Ібупрофену таблетки, вкриті оболонкою, містять ібупрофен.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст ібупрофену ( $C_{13}H_{18}O_2$ ) в таблетці**. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин*. До наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг ібупрофену, додають 50 мл розчину 4 г/л натрію гідроксиду Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

*Спектральна область*: від 240 нм до 300 нм. Використовують спектрофотометр із шириною щілини 1.0 нм і швидкістю сканування не більше 50 нм/хв.

*Максимуми поглинання*: за довжин хвиль 264 нм і 272 нм.

*Плече*: за довжини хвилі 258 нм.

B. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин*. До наважки порошку попередньо звільнених від оболонки таблеток, еквівалентної 50 мг ібупрофену, додають 10 мл метиленхлориду Р, струшують протягом 5 хв і фільтрують.

*Розчин порівняння*. 50 мг ФСЗ ібупрофену розчиняють у метиленхлориді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Пластинка*: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза*: кислота оцтова безводна Р - етилацетат Р - гексан Р (5:24:71).

*Проби, що наносяться*: 5 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза*: 10 см.

*Висушування*: при температурі 120 °С протягом 30 хв.

*Виявлення*: пластинку злегка обприскують розчином 10 г/л калію перманганату Р у кислоті сірчаній розведеної Р і нагрівають при температурі 120 °С протягом 20 хв; переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

## Ібупрофену таблетки, вкриті оболонкою

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням.

**С.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

### ВИПРОБУВАННЯ

#### Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Середовище розчинення:** буферний розчин рН 7.2 Р, 900 мл.

**Обладнання:** прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

**Час розчинення:** 60 хв.

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням аліквоти фільтрату буферним розчином рН 7.2 Р до одержання розчину з підхожою концентрацією ібупрофену, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння.** Готують розчин порівняння ФСЗ ібупрофену або USP Ibuprofen RS у буферному розчині рН 7.2 Р з концентрацією ібупрофену, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

**Компенсаційний розчин.** Буферний розчин рН 7.2 Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 221 нм відносно компенсаційного розчину. Якщо таблетки вкриті оболонкою, що містить желатин, визначення проводять, вимірюючи оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі 266 нм, із якого віднімається значення оптичної густини, виміряної за довжини хвилі 280 нм.

**Нормування:** не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{13}H_{18}O_2$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.2 г ібупрофену, додають 30 мл метанолу Р, струшують протягом 30 хв, додають 30 мл метанолу Р, доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

**Розчин порівняння (а).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (б).** 20 мг ФСЗ ібупрофену розчиняють у 2 мл метанолу Р, додають 1.0 мл розчину

0.06 г/л ФСЗ домішки В ібупрофену в метанолі Р і доводять об'єм розчину метанолом Р до 10.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії Р (5 мкм).

**Рухома фаза:** кислота фосфорна Р - ацетонітрил Р - вода Р (0.5:340:600), після урівноваження доводять об'єм розчину водою Р до 1000 мл.

**Швидкість рухомої фази:** 2.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 214 нм.

**Інжекції:** 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

**Чутливість системи:** чутливість системи регулюють таким чином, щоб висота основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) становила від 70 % до 90 % шкали реєструючого пристрою.

**Час хроматографування:** у 1.5 рази більше часу утримування ібупрофену.

Колонку урівноважують рухомою фазою протягом близько 45 хв.

**Час утримування ібупрофену:** близько 20 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (б):

— відношення пік/западина: не менше 1.5, де  $H_p$  — висота піка домішки В ібупрофену над базовою лінією,  $H_v$  — висота над базовою лінією самої низької точки хроматограми між даним піком і піком ібупрофену. Якщо необхідно, регулюють вміст ацетонітрилу в рухомій фазі.

**Нормування:**

— домішка В: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки В ібупрофену не має перевищувати площу піка домішки В ібупрофену на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.3 %);

— будь-яка інша домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного і піка домішки В ібупрофену, не має перевищувати 0.3 площі піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.3 %);

— сума домішок: на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ усіх піків, крім основного і піка домішки В ібупрофену, не має перевищувати 0.7 площі піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.7 %);

— не враховують: піки, площа яких менше 0.1 площі піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.1 %).

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** Зважують 20 таблеток і визначають середню масу таблетки. Зважені таблетки

розтирають в порошок. До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.2 г ібупрофену, додають 30 мл рухомої фази, струшують протягом 30 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл і перемішують. 25 мл одержаного розчину центрифугують зі швидкістю обертання 2500 об/хв протягом 5 хв. Використовують прозору надосадову рідину.

*Розчин порівняння.* 50.0 мг ФСЗ ібупрофену розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 25.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії Р (10 мкм).

*Рухома фаза:* кислота фосфорна Р - вода Р - метанол Р (3:247:750).

*Швидкість рухомої фази:* 1.5 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 264 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

Розраховують вміст  $C_{13}H_{18}O_2$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на визначену середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{13}H_{18}O_2$  у ФСЗ ібупрофену.

\* Використані матеріали монографії *Ibuprofen Tablets Фармакопеї США*

## КАЛЬЦІУ ГЛЮКОНАТУ ТАБЛЕТКИ

### Calcii gluconatis tabulettae

#### CALCIUM GLUCONATE TABLETS

Кальцію глюконату таблетки містять кальцію глюконат.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст кальцію глюконату ( $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.2 г кальцію глюконату, поміщають у конічну колбу, додають 10 мл води Р, струшують протягом 10 хв, нагріваючи на водяній бані при температурі 60 °С, і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 20 мг ФСЗ кальцію глюконату розчиняють у 1 мл води Р, нагріваючи, якщо необхідно, на водяній бані при температурі 60 °С.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю G Р.

*Рухома фаза:* розчин аміаку концентрований Р - етил-ацетат Р - вода Р - 96 % спирт Р (10:10:30:50).

*Проби, що наносяться:* 5 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* при температурі 100 °С протягом 20 хв; пластинку залишають до охолодження.

*Виявлення:* пластинку обприскують розчином 50 г/л калію дихромату Р у 40 % (м/м) розчині кислоти сірчаної Р; переглядають через 5 хв.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням.

В. Порошок таблеток дає реакції на кальцій (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ

##### Розчинення (2.9.3).

*Випробування проводять одним із наведених нижче методів.*

**Метод 1.** Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23).

*Середовище розчинення:* вода Р, 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Використовують фільтрат або розчин фільтрату, розведений водою Р до підхожої концентрації кальцію.

*Розчини порівняння.* Готують відповідним розведенням еталонного розчину кальцію (100 ppm Ca) Р водою Р.

Поглинання випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 422.7 нм, використовуючи як джерело випромінювання лампу з порожнистим кальцієвим катодом і повітряно-ацетиленове полум'я.

1 мг Са відповідає 11.21 мг  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ .



**Каптоприлу таблетки**

**Нормування:** не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ .

**Метод 2.**

**Середовище розчинення:** 0.01 M розчин кислоти хлористоводневої; 500 мл.

**Обладнання:** прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

**Час розчинення:** 45 хв.

**Дозована одиниця:** необхідна кількість таблеток для забезпечення у посудині для розчинення сумарного вмісту кальцію глюконату 1.5 г.

**Випробовуваний розчин.** Використовують фільтрат.

50.0 мл одержаного розчину поміщають у конічну колбу та далі поступають, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», починаючи зі слів «...додають 10 мл аміачного буферного розчину рН 10.0 Р...».

**Нормування:** не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 2.5 г кальцію глюконату, поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 10 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р, 50 мл води Р, нагрівають на водяній бані протягом 10 хв. Одержаний розчин охолоджують, доводять об'єм розчину водою Р до позначки, перемішують і фільтрують. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у конічну колбу, додають 10 мл аміачного буферного розчину рН 10.0 Р, 0.1 г індикаторної суміші протравного чорного 11 Р і титрують 0.05 М розчином натрію едетату<sup>N</sup> до переходу червоно-фіолетового забарвлення в синє.

1 мл 0.05 М розчину натрію едетату<sup>N</sup> відповідає 22.42 мг  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ .

Розраховують вміст  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки.

**КАПТОПРИЛУ ТАБЛЕТКИ****Captoprili tabulettae****CAPTOPRIL TABLETS**

Каптоприлу таблетки містять каптоприл.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст каптоприлу ( $C_9H_{15}NO_3S$ ) в таблетці.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.\*** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.1 г каптоприлу, поміщають у конічну колбу, додають 25 мл метанолу Р, перемішують, використовуючи магнітну мішалку, протягом 30 хв і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

**Розчин порівняння.** 20 мг ФСЗ каптоприлу розчиняють у 5 мл метанолу Р.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю G Р.

**Рухома фаза:** метанол Р - кислота оцтова льодяна Р - толуол Р (1:25:75).

**Проби, що наносяться:** 50 мкл, смугами; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:**  $\frac{3}{4}$  довжини пластинки.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** пластинку обприскують свіжоприготованою сумішшю розчин аміаку концентрований Р - розчин 0.4 г/л 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) Р у метанолі Р (1:6).

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна зона на рівні основної зони на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування піка каптоприлу на хроматограмі розчину порівняння.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

Каптоприлу дисульфід. Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Розчини готують безпосередньо перед використанням.*

*Випробовуваний розчин.* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 25 мг каптоприлу, поміщають у центрифужну пробірку, додають 25.0 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

*Розчин порівняння (а).* 30 мг ФСЗ каптоприлу дисульфиду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 200.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять розчином порівняння (а) до об'єму 100.0 мл.

*Колонка:*

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* кислота фосфорна концентрована Р - вода Р - метанол Р (0.5:450:550).

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (б):

- коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків каптоприлу і каптоприлу дисульфиду.

*Нормування:*

- на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка каптоприлу дисульфиду не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (3.0 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Розчини готують безпосередньо перед використанням.*

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг каптоприлу, додають 25 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину до 50.0 мл, струшують протягом 15 хв і фільтрують. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння.* 50.0 мг ФСЗ каптоприлу розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину

рухомою фазою до 50.0 мл. 5 мг ФСЗ каптоприлу дисульфиду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. По 5.0 мл кожного з одержаних розчинів поміщають у мірну колбу та доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

*Колонка:*

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний ендкепований для хроматографії Р (10 мкм).

*Рухома фаза:* кислота фосфорна концентрована Р - вода Р - метанол Р (0.5:450:550).

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

- коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків каптоприлу і каптоприлу дисульфиду.

Розраховують вміст  $C_9H_{15}NO_3S$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_9H_{15}NO_3S$  у ФСЗ каптоприлу.

\* Використані матеріали монографії *Caripril Tablets Фармакопеї США*

## КАРБАМАЗЕПІНУ ТАБЛЕТКИ

### Carbamazepini tabulettae

#### CARBAMAZEPINE TABLETS

Карбамазепіну таблетки містять карбамазепін.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст карбамазепіну ( $C_{15}H_{12}N_2O$ ) в таблетці.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.\*** Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Підготовка зразка:* наважку порошку таблеток, еквівалентну близько 0.25 г карбамазепіну, поміщають у

## Карбамазепіну таблетки

хімічну склянку місткістю 50 мл, додають 15 мл *ацетону Р* і кип'ятять протягом 5 хв. Розчин фільтрують гарячим у другу хімічну склянку, залишки розчину переносять за допомогою двох порцій гарячого *ацетону Р* по 5 мл. Фільтрат упарюють у потоці азоту приблизно до 5 мл і охолоджують на льодяній бані до утворення кристалів. Кристали відфільтровують, промивають 3 мл холодного *ацетону Р* і сушать у вакуумі при температурі 70 °С протягом 30 хв. Залишок досліджують у дисках із калію бромідом.

**Відповідність:** спектру *ФСЗ карбамазепіну* або USP Carbamazepine RS.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b).

### ВИПРОБУВАННЯ

#### Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Середовище розчинення:** розчин 10 г/л натрію лаурилсульфату *Р*; 900 мл.

**Обладнання:** прилад 2, швидкість обертання 75 об/хв.

**Час розчинення:** 60 хв.

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням аліквоти фільтрату розчином 10 г/л натрію лаурилсульфату *Р* до одержання розчину з концентрацією близько 10 мкг/мл карбамазепіну, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння.** 50.0 мг *ФСЗ карбамазепіну* або USP Carbamazepine RS розчиняють у 5 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину розчином 10 г/л натрію лаурилсульфату *Р* до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять розчином 10 г/л натрію лаурилсульфату *Р* до об'єму 50.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** Розчин 10 г/л натрію лаурилсульфату *Р*.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 288 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{15}H_{12}N_2O$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин (a).** До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.3 г карбамазепіну, додають 100 мл *метанолу Р2*, струшують протягом

15 хв, доводять об'єм розчину *водою Р* до 200.0 мл, переміщують і фільтрують.

**Випробовуваний розчин (b).** 10.0 мл випробовуваного розчину (a) доводять сумішшю рівних об'ємів *метанолу Р2* і *води Р* до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (a).** 7.5 мг *ФСЗ карбамазепіну*, 7.5 мг *ФСЗ карбамазепіну домішки А* та 7.5 мг *імінодобензилу Р* (домішка Е) розчиняють у *метанолі Р2* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять сумішшю рівних об'ємів *метанолу Р2* і *води Р* до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 60.0 мг *ФСЗ карбамазепіну* розчиняють у *метанолі Р2*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл і витримують в ультразвуковій бані. 5.0 мл одержаного розчину доводять сумішшю рівних об'ємів *метанолу Р2* і *води Р* до об'єму 50.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— *нерухома фаза:* силікагель нітрильний для хроматографії *Р1* (10 мкм).

**Рухома фаза:** тетрагідрофуран *Р* - *метанол Р2* - *вода Р* (3:12:85). До 1000 мл одержаного розчину додають 0.2 мл *кислоти мурашиної безводної Р* і 0.5 мл *триетиламіну Р*.

**Швидкість рухомої фази:** 2.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 230 нм.

**Інжекції:** 20 мкл; вводять випробовуваний розчин (a) і розчин порівняння (a).

**Час хроматографування:** у 6 разів більше часу утримування карбамазепіну.

**Відносні часи утримування до карбамазепіну** (час утримування карбамазепіну близько 10 хв): домішки А — близько 0.9; домішки Е — близько 5.1.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (a):

— *коефіцієнт розділення:* не менше 1.7 для піків карбамазепіну та домішки А.

**Нормування:**

— *домішки А, Е:* на хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа піка кожної домішки не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.1 %);

— *будь-яка інша домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа будь-якого іншого піка не має перевищувати площу піка карбамазепіну на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.1 %);

— *сума домішок:* на хроматограмі випробовуваного розчину (a) сума площ усіх будь-яких інших піків не має перевищувати 5 площ піка карбамазепіну на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);

— не враховують: піки, площа яких менше 0.5 площі піка карбамазепіну на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.05 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено в розділі «Супровідні домішки», із такими змінами.

*Інжекції*: 20 мкл; вводять випробовуваний розчин (b) і розчин порівняння (b).

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння (b):

— *збіжність*: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{15}H_{12}N_2O$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблеток, виходячи із заявленого вмісту  $C_{15}H_{12}N_2O$  у ФСЗ карбамазепіну.

\* Використані матеріали монографії *Carbamazepine Tablets Фармакопеї США*

## КИСЛОТИ АСКОРБІНОВОЇ РОЗЧИН ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ, 50 МГ/МЛ

### Acidi ascorbici solutio pro injectionibus

#### ASCORBIC ACID INJECTION

Кислоти аскорбінової розчин для ін'єкцій, 50 мг/мл, є стерильним розчином кислоти аскорбінової у воді для ін'єкцій, із натрію гідрокарбонатом та натрію сульфітом у складі препарату.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст кислоти аскорбінової ( $C_6H_8O_6$ )**. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**Опис**. Прозора, безбарвна або злегка жовтувата рідина.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

▶ А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин*. 1 мл препарату доводять водою Р до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння*. 50 мг ФСЗ кислоти аскорбінової розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Пластинка*: ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р.

*Рухома фаза*: 96 % спирт Р - вода Р (120:20).

*Проби, що наносяться*: 2 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза*: до кінця пластинки.

*Висушування*: на повітрі.

*Виявлення*: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати*: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром. ▲

**В**. До 1 мл препарату додають 0.2 мл кислоти азотної розведеної Р і 0.2 мл розчину срібла нітрату Р2; утворюється сірий осад.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**pH** (2.2.3). Від 6.0 до 7.0.

**Кислота шавлева**.

*Випробовуваний розчин*. До 5 мл препарату додають 1 мл кислоти оцтової розведеної Р і 0.5 мл розчину кальцію хлориду Р.

*Розчин порівняння*. 70 мг кислоти шавлевої Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500 мл. До 5 мл одержаного розчину додають 1 мл кислоти оцтової розведеної Р і 0.5 мл розчину кальцію хлориду Р.

Розчини витримують протягом 1 год. Опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію розчину порівняння.

*Нормування*: 0.3 %.

**Бактеріальні ендотоксини** (2.6.14). Менше 1.2 МО/мг кислоти аскорбінової.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

▶ До 4.0 мл препарату додають 6 мл води Р, 0.25 мл розчину 30 г/л формальдегіду Р, 4 мл суміші кислота хлористоводнева розведена Р - вода Р (1:3), 0.5 мл розчину 10 г/л калію йодиду Р, 2 мл розчину крохмалю, вільного від йодидів, Р і титрують 0.0167 М розчином калію йодату<sup>Н</sup> до появи стійкого світло-синього забарвлення.

1 мл 0.0167 М розчину калію йодату<sup>Н</sup> відповідає 8.81 мг  $C_6H_8O_6$ . ▲

Розраховують вміст  $C_6H_8O_6$  у 1 мл препарату, у міліграмах.

## КИСЛОТИ АСКОРБІНОВОЇ ТАБЛЕТКИ

### Acidi ascorbici tabulettae

#### ASCORBIC ACID TABLETS

Кислоти аскорбінової таблетки містять кислоту аскорбінову.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст кислоти аскорбінової ( $C_6H_8O_6$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 50 мг кислоти аскорбінової, струшують з 10 мл *води Р* протягом 15 хв і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 50 мг ФСЗ кислоти аскорбінової розчиняють у 10 мл *води Р*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254} Р$ .

*Рухома фаза:* 96 % спирт *Р* - вода *Р* (120:20).

*Проби, що наносяться:* 2 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* до кінця пластинки.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**B.** Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.5 г кислоти аскорбінової, струшують з 10 мл *води Р* протягом 15 хв і фільтрують. До 1 мл одержаного розчину додають 0.2 мл *кислоти азотної розведеної Р* і 0.2 мл *розчину срібла нітрату Р2*; утворюється сірий осад.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

До точної наважки порошку розтертих таблеток, еквівалентної 0.15 г кислоти аскорбінової, додають 10 мл *води Р*, струшують протягом 15 хв, додають 1 мл суміші *кислота хлористоводнева розведена Р - вода Р* (1:3), 0.5 мл розчину 10 г/л *калію йодиду Р*, 2 мл *розчину крохмалю, вільного від йодидів, Р* і титрують 0.0167 М *розчином калію йодату<sup>N</sup>* до появи стійкого світло-синього забарвлення.

1 мл 0.0167 М *розчину калію йодату<sup>N</sup>* відповідає 8.81 мг  $C_6H_8O_6$ .

Розраховують вміст  $C_6H_8O_6$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки.

## КЛОПІДОГРЕЛЮ ТАБЛЕТКИ<sup>N</sup>

### Clopidogreli tabulettae

#### CLOPIDOGREL TABLETS

Клопідогрелю таблетки містять клопідогрелю гідросульфат, у перерахунку на клопідогрель.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст клопідогрелю ( $C_{16}H_{16}ClNO_2S$ ). Не менше 92.5 % і не більше 107.5 % від зазначеного вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Ультрафіолетовий спектр поглинання (2.2.25) розчину, приготованого у випробуванні «Однорідність дозованих одиниць», в області від 250 нм до 300 нм повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння, приготований у випробуванні «Однорідність дозованих одиниць».

**B.** Переглядають хроматограму, одержану в розділі «Кількісне визначення».

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

#### ВИПРОБУВАННЯ

► **Розчинення (2.9.3).**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, *метод стандарту*)

*Середовище розчинення:* середовище з кислотою хлористоводневою (2.9.3), приготоване з використанням 0.2 М розчину *калію хлориду Р*; 1000 мл.

*Прилад:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

Час розчинення: 30 хв.

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням аліквоти фільтрату середовищем розчинення до одержання розчину з концентрацією клопідогрелю близько 0.04 мг/мл, розрахованою відносно номінального вмісту клопідогрелю.

**Розчин порівняння.** Готують розчин порівняння ФСЗ клопідогрелю гідросульфату у метанолі Р з концентрацією клопідогрелю гідросульфату близько 1.2 мг/мл. Одержаний розчин доводять середовищем розчинення до одержання розчину з концентрацією клопідогрелю гідросульфату близько 0.05 мг/мл.

**Компенсаційний розчин.** Середовище розчинення.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 240 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** не менше 80 % (Q) від номінального вмісту клопідогрелю. ▲

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).**

1 таблетку поміщають у мірну колбу, додають 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл, витримують в ультразвуковій бані протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують крізь підходящий фільтр із розміром пор 0.45 мкм або менше, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Одержаний фільтрат розводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з концентрацією клопідогрелю 0.15 мг/мл.

Визначення проводять спектрофотометрично в максимумі за довжини хвилі 270 нм, використовуючи розчин порівняння, приготований таким чином: 100.0 мг ФСЗ клопідогрелю гідросульфату розчиняють в 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл, 5.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29) в умовах, описаних у розділі «Кількісне визначення».

**Випробовуваний розчин.** Зважують і тонко здрібнюють на порошок 20 таблеток. Наважку порошку, еквівалентну 75 мг клопідогрелю, розчиняють у 5 мл метанолу Р, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 200.0 мл, перемішують, витримують протягом 10 хв і знову перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь підходящий фільтр із розміром пор 0.45 мкм або менше, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

**Розчин порівняння (а).** Наважки ФСЗ клопідогрелю гідросульфату, ФСЗ клопідогрелю домішки А, ФСЗ клопідогрелю домішки С розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину метанолом Р до одержання розчину з концентраціями 40 мкг/мл, 250 мкг/мл, 300 мкг/мл, відповідно. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 200.0 мл і пере-

мішують, одержуючи таким чином розчин з концентраціями близько 1 мкг/мл, 6 мкг/мл, 7.5 мкг/мл, відповідно.

Хроматографують розчин порівняння (б), приготований, як зазначено в розділі «Кількісне визначення», і розчин порівняння (а).

**Відносні часи утримування** до клопідогрелю (час утримування клопідогрелю близько 5.3 хв), визначені із хроматограми розчину порівняння (б): двох енантіомерів домішки В — близько 0.8 і 1.2, відповідно; визначені із хроматограми розчину порівняння (а): домішки А — близько 0.5; домішки С — близько 2.0.

**Придатність хроматографічної системи:**

— коефіцієнт розділення: не менше 2.5 для піків клопідогрелю та першого енантіомера домішки В на хроматограмі розчину порівняння (б).

Хроматографують декілька разів ( $n_0$ ) розчин порівняння (а).

Визначають відносне стандартне відхилення для площі піка кожної домішки (RSD). Величина  $n_0$  є достатньою, якщо одержане значення RSD не перевищує  $RSD_{max}$ , наведене нижче.

$n_0$	2	3	4
RSD <sub>max</sub> %	2.5	6.7	9.6

Якщо одержана величина RSD не перевищує  $RSD_{max}$ , попеременно хроматографують однакову кількість  $n \geq n_0$  разів розчин порівняння (а) та випробовуваний розчин.

Хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння (а).

Вміст домішки А та домішки С, у відсотках до зазначеного вмісту клопідогрелю у таблетці, обчислюють за формулою:

$$\frac{20 \times 321.82 \times C \times m_0 \times S}{419.90 \times t \times a \times S_0}$$

де:

321.82 — молекулярна маса клопідогрелю,

419.90 — молекулярна маса клопідогрелю гідросульфату,

C — вміст домішки А або домішки С у розчині порівняння (а), у мікрограмах на мілілітр,

t — маса наважки порошку таблеток, що взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах,

$m_0$  — середня маса однієї таблетки, у міліграмах,

a — зазначений вміст клопідогрелю в одній таблетці, у міліграмах,

S — площа піка домішки А або домішки С на хроматограмі випробовуваного розчину,

$S_0$  — площа піка домішки А або домішки С на хроматограмі розчину порівняння (а).

## Клопідогрелю таблетки<sup>N</sup>

Вміст будь-якої іншої домішки (крім домішки В), у відсотках до зазначеного вмісту клопідогрелю у таблетці, обчислюють за формулою:

$$\frac{20 \times 321.82 \times C_c \times m_0 \times S}{419.90 \times m \times a \times S_0}$$

де:

321.82 — молекулярна маса клопідогрелю,

419.90 — молекулярна маса клопідогрелю гідросульфату,

$C_c$  — вміст клопідогрелю гідросульфату в розчині порівняння (а), у мікрограмах на мілілітр,

$m$  — маса наважки порошку таблеток, що взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах,

$m_0$  — середня маса однієї таблетки, у міліграмах,

$a$  — зазначений вміст клопідогрелю в одній таблетці, у міліграмах,

$S$  — площа піка будь-якої іншої домішки на хроматограмі випробовуваного розчину,

$S_0$  — площа піка будь-якої іншої домішки на хроматограмі розчину порівняння (а).

### Нормування:

Вміст усіх супровідних домішок обчислюють у перерахунку на гідросульфат, виходячи із заявленого вмісту гідросульфату у ФСЗ відповідної домішки.

— домішка А: не більше 1.2 %,

— домішка С: не більше 1.5 %,

— будь-яка інша домішка (крім домішки В): не більше 0.2 %,

— сума домішок (крім домішки В): не більше 2.5 %.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Випробовуваний розчин.** Зважують і тонко здрібнюють на порошок 20 таблеток. До наважки порошку, еквівалентної 75 мг клопідогрелю, додають 50 мл метанолу Р, витримують в ультразвуковій бані протягом 5 хв, перемішують протягом 30 хв, доводять об'єм розчину метанолом Р до 100.0 мл і знову перемішують. 5.0 мл одержаного розчину доводять метанолом Р до об'єму 50.0 мл і перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь підходящий фільтр із розміром пор 0.45 мкм або менше, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

**Розчин порівняння (а).** Наважку ФСЗ клопідогрелю гідросульфату розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину метанолом Р до одержання розчину з концентрацією 0.1 мг/мл.

Вміст усіх супровідних домішок обчислюють у перерахунку на гідросульфат, виходячи із заявленого вмісту гідросульфату у ФСЗ відповідної домішки.

**Розчин порівняння (б).** Наважки ФСЗ клопідогрелю гідросульфату, ФСЗ клопідогрелю домішки В розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину метанолом Р до одержання розчину з концентраціями

100 мкг/мл, 200 мкг/мл, відповідно. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 200.0 мл і перемішують.

### Колонка:

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм,

— *нерухома фаза*: овомукоїд, білок, що здатний розпізнавати оптичні ізомери, хімічно прищеплений до частинок силікагелю близько 5 мкм діаметром і розміром пор близько 120 Å.

**Рухома фаза:** суміш фосфатний буферний розчин — ацетонітрил Р (75:25) фільтрують та дегазують. Фосфатний буферний розчин готують таким чином: 1.36 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у 500 мл води Р і доводять об'єм розчину водою Р до 1000 мл. Якщо необхідно, регулюють склад рухомої фази.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

**Об'єм проби, що вводиться:** 10 мкл.

Хроматографують розчини порівняння (б) і (а).

**Відносні часи утримування до клопідогрелю** (час утримування клопідогрелю близько 5.3 хв), визначені із хроматограми розчину порівняння (б): двох енантіомерів домішки В — близько 0.8 і 1.2, відповідно.

**Придатність хроматографічної системи:**

— *коефіцієнт розділення*: не менше 2.5 для піків клопідогрелю та першого енантіомера домішки В на хроматограмі розчину порівняння (б).

Хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння (а).

Вміст клопідогрелю ( $C_6H_{16}ClNO_2S$ ) в одній таблетці, рахуючи на середню масу таблетки, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$\frac{1000 \times 321.82 \times C \times m_0 \times S}{419.90 \times m \times S_0}$$

де:

321.82 — молекулярна маса клопідогрелю,

419.90 — молекулярна маса клопідогрелю гідросульфату,

$C$  — вміст ФСЗ клопідогрелю гідросульфату у розчині порівняння, у міліграмах на мілілітр,

$S$  — площа піка клопідогрелю на хроматограмі випробовуваного розчину,

$S_0$  — площа піка клопідогрелю на хроматограмі розчину порівняння,

$m_0$  — середня маса однієї таблетки, у міліграмах,

$m$  — маса наважки порошку таблеток, що взята для приготування випробовуваного розчину, у міліграмах.

## ЛІДОКАЇНУ РОЗЧИН ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Lidocaini solutio pro injectionibus

#### LIDOCAINE INJECTION

Лідокаїну розчин для ін'єкцій є стерильним розчином лідокаїну гідрохлориду у воді для ін'єкцій.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст лідокаїну гідрохлориду безводного (C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O).** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**Опис.** Прозора, безбарвна або злегка забарвлена рідина.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).**

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, приготований для кількісного визначення.

**Спектральна область:** від 220 нм до 320 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

**В.** До об'єму препарату, еквівалентного 0.2 г лідокаїну гідрохлориду, додають 10 мл розчину пікринової кислоти Р. Одержаний осад (пікрат) промивають водою Р і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С. Температура плавлення (2.2.14) пікрату має бути близько 230 °С.

**С.** Об'єм препарату, еквівалентний 0.1 г лідокаїну гідрохлориду, підлужують розчином натрію гідроксиду розведеним Р і фільтрують. Осад збирають на фільтрі та промивають водою Р. Осад розчиняють у 1 мл 96 % спирту Р, додають 0.5 мл розчину 100 г/л кобальту нітрату Р і струшують протягом 2 хв; утворюється синювато-зелений осад.

**Д.** Препарат дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**pH (2.2.3).** Від 5.0 до 7.0.

#### 2.6-Диметиланілін.

*Розчин (а).* До об'єму препарату, еквівалентного 25 мг лідокаїну гідрохлориду, додають воду Р до об'єму 10 мл, 1 мл 1 М розчину натрію гідроксиду й екстрагують хлороформом Р три рази по 5 мл. Об'єднані хлороформні витяги сушать над 3 г натрію сульфату безводного Р у колбі місткістю 50 мл протягом 10 хв і фільтрують. Колбу і фільтр промивають 5 мл хлороформу Р, який приєднують до об'єднаних хлороформних витягів; фільтрат упарюють насухо за тиску 2 кПа. Залишок розчиняють у 2 мл метанолу Р.

*Розчин (б).* 50 мг 2,6-диметиланіліну Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 1 мл одержаного розчину доводять метанолом Р до об'єму 100 мл.

У двох пробірках з притертою пробкою готують такі розчини. У першу пробірку поміщають розчин (а), у другу — 2 мл розчину (б). У кожен із пробірок додають по 1 мл свіжоприготованого розчину 10 г/л диметиламінобензальдегіду Р у метанолі Р і 2 мл кислоти оцтової льодяної Р. Одержані розчини витримують при кімнатній температурі протягом 10 хв.

Жовте забарвлення випробовуваного розчину (перша пробірка) не має бути інтенсивнішим за забарвлення еталонного розчину (друга пробірка).

**Нормування:** 0.04 % (400 ppm).

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 1.1 МО/мг лідокаїну гідрохлориду. Якщо препарат застосовують інтратекально, граничний вміст ендотоксинів розраховують, як зазначено у статті «Бактеріальні ендотоксини» (2.6.14) для інтратекального шляху введення.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).**

*Випробовуваний розчин.* До точно виміряного об'єму препарату, еквівалентного 0.1 г лідокаїну гідрохлориду, додають 50 мл води Р, 50 мл 96 % спирту Р, перемішують, додають 25 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять водою Р до об'єму 250.0 мл і перемішують.

*Розчин порівняння.* 80.0 мг ФСЗ лідокаїну гідрохлориду розчиняють у 40 мл 96 % спирту Р, додають 20 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять об'єм розчину водою Р до 200.0 мл і перемішують.

*Компенсаційний розчин.* До 10 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої додають 20 мл 96 % спирту Р, доводять водою Р до об'єму 100.0 мл і перемішують.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 263 нм відносно компенсаційного розчину.



**Метронідазолу гель**

Розраховують вміст  $C_{14}H_{22}ClN_3O$  в 1 мл, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{14}H_{22}ClN_3O$  у ФСЗ лідокаїну гідрохлориду.

**МЕТРОНИДАЗОЛУ ГЕЛЬ****Metronidazoli gel****METRONIDAZOLE GEL**

Метронідазолу гель містить метронідазол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування» і додатково підрозділу «Гелі» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст метронідазолу ( $C_6H_9N_3O_3$ ). Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ****А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).**

*Випробовуваний розчин.* До наважки гелю, еквівалентної 7.5 мг метронідазолу, додають 15 мл води Р, струшують до одержання однорідної суміші, витримують в ультразвуковій бані протягом 10 хв. Аліквоту одержаного розчину пропускають крізь хроматографічну колонку. Використовують елюат.

*Розчин порівняння.* Точну наважку ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS розчиняють у воді Р до концентрації близько 0.5 мг/мл метронідазолу.

*Колонка:* хроматографічна колонка розміром 10 мм × 0.15 м, заповнена шаром іонно-обмінної смоли висотою 10 см, яка обмежена знизу та зверху тампонами зі скловолокна.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю F<sub>254</sub> Р.

*Рухома фаза:* хлороформ Р - метанол Р - аміаку розчин концентрований Р (6:3:1).

*Проби, що наносяться:* 5 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* ¼ довжини пластинки.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**рН (2.2.3).** Від 4.0 до 6.5.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки гелю, еквівалентної 7.5 мг метронідазолу, додають 50 мл рухомої фази, струшують, використовуючи механічний прилад, протягом 20 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. Центрифугують аліквоту одержаного розчину і використовують прозору надосадову рідину.

*Розчин порівняння.* Точну наважку ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS розчиняють у рухомій фазі, розводять аліквоту одержаного розчину рухомою фазою до концентрації близько 75 мкг/мл метронідазолу.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* 1.5 г калію дигідрофосфату Р і 1.3 г динатрію гідрофосфату Р розчиняють у 350 мл води Р, додають 650 мл метанолу Р, перемішують, фільтрують і дегазують. При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— коефіцієнт симетрії: не більше 2.0 для піка метронідазолу;

— збіжність: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_6H_9N_3O_3$  в 1 г гелю, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_6H_9N_3O_3$  у ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS.

*Монографія розроблена на підставі монографії Metronidazole Gel Фармакопеї США*

## МЕТРОНІДАЗОЛУ КАПСУЛИ

## Metronidazoli capsulae

## METRONIDAZOLE CAPSULES

Метронідазолу капсули містять метронідазол.

Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.

Вміст метронідазолу ( $C_6H_9N_3O_3$ ) в капсулі. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Спектральна область: від  $1600\text{ см}^{-1}$  до  $1000\text{ см}^{-1}$ .

Відповідність: спектру ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS.

В. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

## Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

Середовище розчинення: 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

Обладнання: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

Час розчинення: 30 хв.

Випробовуваний розчин. Розчин фільтрують крізь нейлоновий фільтр з діаметром пор 0.45 мкм, відкидаючи першу порцію фільтрату.

Розчин порівняння. Точну наважку ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої до концентрації близько 0.4 мг/мл метронідазолу. При необхідності розчиняють в ультразвуковій бані.

Компенсаційний розчин. 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

Нормування: не менше 85 % (Q) від номінального вмісту  $C_6H_9N_3O_3$ .

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Витримують вимоги.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин (a). Змішують вміст 20 капсул. До точної наважки вмісту капсул, еквівалентної близько 0.1 г метронідазолу, додають 80 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані протягом 10 хв, потім струшують, використовуючи механічний прилад, протягом 30 хв і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. Центрифугують аліквоту одержаного розчину і використовують надосадову рідину з концентрацією 1 мг/мл метронідазолу.

Розчин порівняння. Точні наважки ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS і ФСЗ 2-метил-5-нітроїмідазолу або USP Tinidazole Related Compound A RS розчиняють у рухомій фазі до концентрації близько 1 мкг/мл метронідазолу і близько 2 мкг/мл 2-метил-5-нітроїмідазолу або тинідазолу домішки А, відповідно.

Колонка:

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октилсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 30 °С.

Рухома фаза: вода Р - метанол Р (4:1). При необхідності коригують.

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 319 нм.

Інжекції: 30 мкл; випробовуваний розчин (a) і розчин порівняння.

Відносний час утримування: близько 0.75 для піка 2-метил-5-нітроїмідазолу або тинідазолу домішки А і 1.0 для піка метронідазолу.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

— коефіцієнт розділення: не менше 2.0 для піків метронідазолу і 2-метил-5-нітроїмідазолу або тинідазолу домішки А;

— коефіцієнт симетрії: не більше 2.0 для піка метронідазолу;

— відносне стандартне відхилення: не більше 6.0 % для піків метронідазолу і 2-метил-5-нітроїмідазолу або тинідазолу домішки А для 6 інжекцій.

Нормування:

— 2-метил-5-нітроїмідазол або тинідазолу домішка А: на хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа піка 2-метил-5-нітроїмідазолу або тинідазолу домішки А не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.1 %);

— будь-яка домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину (a) площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.1 %);

## Метронідазолу песарії

— *сума домішок*: на хроматограмі випробовуваного розчину (а) сума площ усіх піків, крім основного, має бути не більше 0.5 %.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки», з такими змінами:

*Випробовуваний розчин (b)*. Розводять аликвоту випробовуваного розчину (а), приготованого для визначення супровідних домішок, у рухомій фазі до концентрації близько 30 мкг/мл метронідазолу. Розчин фільтрують крізь нейлоновий фільтр з діаметром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 10 мл фільтрату.

*Розчин порівняння*. Точну наважку ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS розчиняють у рухомій фазі до концентрації близько 30 мкг/мл метронідазолу.

*Інжекції*: 30 мкл; випробовуваний розчин (b) і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи*: розчин порівняння:

- *коефіцієнт симетрії*: не більше 2.0 для піка метронідазолу;
- *збіжність*: відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_6H_9N_3O_3$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_6H_9N_3O_3$  у ФСЗ метронідазолу або USP Metronidazole RS.

*Монографія розроблена на підставі монографії Metronidazole Capsules Фармакопеї США*

## МЕТРОНІДАЗОЛУ ПЕСАРІЇ

### Metronidazoli pessaria

#### METRONIDAZOLE PESSARIES

Метронідазолу песарії містять метронідазол у відповідній ліпофільній основі.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для вагінального застосування» і додатково підрозділу «Песарії» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст метронідазолу ( $C_6H_9N_3O_3$ ) в песарії. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин*. Наважку розтертого песарію, еквівалентну близько 125 мг метронідазолу, розчиняють у 100 мл суміші *хлороформ Р - метанол Р* (1:1). До 1 мл одержаного розчину додають 1 мл 0.1 М розчину *натрію гідроксиду*, доводять об'єм розчину *метанолом Р* до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин*. *Метанол Р*.

*Спектральна область*: від 280 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за довжини хвилі 310 нм.

**B.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

### ВИПРОБУВАННЯ

**Однорідність дозованих одиниць** (2.9.40). Витримують вимоги.

**Супровідні домішки**. Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин*. 20 песаріїв ретельно розтирають до одержання гомогенної маси. До наважки розтертої песарної маси, еквівалентної 0.2 г метронідазолу, додають 100 мл *гексану Р*, перемішують до повного розчинення основи. Потім додають 800 мл *води Р* з рН, який попередньо доведений до 2.5 *кислотою фосфорною Р*, перемішують до повного розчинення осаду, переносять у ділильну лійку, струшують протягом 5 хв і залишають до розшарування фаз. Відокремлюють 50 мл водного шару (нижня фаза), фільтрують.

*Розчин порівняння*. 25 мг ФСЗ 2-метил-5-нітроімідазолу розчиняють у 96 % *спирті Р* та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 0.5 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

*Колонка*:

- *розмір*: 0.15 м × 4.6 мм;
- *нерухома фаза*: *силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р* (5 мкм);
- *температура*: 30 °С.

*Рухома фаза*: розчин 10 г/л *натрію дигідрофосфату Р*, рН якого доведений до 5.0 *розчином натрію гідроксиду Р - метанол Р* (85:15).

*Швидкість рухомої фази*: 1 мл/хв.

*Детектування*: спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Час хроматографування:* у 2.5 рази більше часу утримування основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— висота піка 2-метил-5-нітроїмідазолу має становити не менше 50 % шкали реєструючого приладу.

*Нормування:*

— *будь-яка домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.5 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки», з такими змінами:

*Розчин порівняння.* 50 мг ФСЗ метронідазолу розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200.0 мл.

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_6H_9N_3O_3$  в одному песарії, у міліграмах, у перерахунку на середню масу песарію, виходячи із заявленого вмісту  $C_6H_9N_3O_3$  у ФСЗ метронідазолу.

## МЕТРОНІДАЗОЛУ РОЗЧИН ДЛЯ ІНФУЗІЙ

### Metronidazoli solutio pro infusionibus

#### METRONIDAZOLE INFUSION

Метронідазолу розчин для інфузій є стерильним розчином метронідазолу у воді для ін'єкцій.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст метронідазолу ( $C_6H_9N_3O_3$ ).** Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 230 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d).

## ВИПРОБУВАННЯ

**pH (2.2.3).** Від 4.5 до 7.0.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Розчини готують у захищеному від світла місці.*

*Випробовуваний розчин.* Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 10 мг метронідазолу, доводять рухомою фазою до 10.0 мл.

*Розчин порівняння (a).* 5.0 мг ФСЗ 2-метил-5-нітроїмідазолу розчиняють у 80 мл рухомої фази і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 2.5 мл розчину порівняння (a) доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (c).* До 0.5 мл розчину порівняння (a) додають об'єм препарату, еквівалентний 10 мг метронідазолу, і доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (d).* 10 мг ФСЗ метронідазолу розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

Приготування рухомої фази та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії *Метронідазол*, з такими змінами:

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (a), (b), (c), (d).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (c):

— *коефіцієнт розділення:* не менше 2.0 для піків метронідазолу та 2-метил-5-нітроїмідазолу.

**Нормування:**

— *будь-яка дамішка*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %).

**Нітриги.** Абсорбційна спектрофотометрія у видимій області (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** До об'єму препарату, еквівалентному 2.5 мг метронідазолу, додають 40 мл води Р, 2 мл розчину кислоти сульфанілової Р<sup>N</sup>, 2 мл розчину кислоти амінонафталенсульфонової Р<sup>N</sup>, доводять об'єм розчину водою Р до 50 мл і відстоюють при кімнатній температурі протягом 1 год.

**Розчин порівняння.** До 1 мл еталонного розчину нітриту (20 ppm NO<sub>2</sub>) Р<sup>N</sup> додають 40 мл води Р і далі поступають, як зазначено для випробовуваного розчину, починаючи зі слів «...2 мл розчину кислоти сульфанілової Р<sup>N</sup>...».

**Компенсаційний розчин.** До 1 мл води Р додають 40 мл води Р і далі поступають, як зазначено для випробовуваного розчину, починаючи зі слів «...2 мл розчину кислоти сульфанілової Р<sup>N</sup>...».

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 524 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** 0.8 % відносно вмісту метронідазолу.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.35 МО/мг метронідазолу, якщо препарат застосовують у максимальній дозі 15 мг на кілограм маси тіла за годину або менше. Якщо препарат застосовують у максимальній дозі більше 15 мг на кілограм маси тіла за годину, граничний вміст розраховують, як зазначено у статті «Бактеріальні ендотоксини» (2.6.14).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Випробовуваний розчин.** Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 25 мг метронідазолу, доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 25.0 мл.

**Розчин порівняння.** 25.0 мг ФСЗ метронідазолу розчиняють у 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 50.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 277 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст С<sub>6</sub>Н<sub>9</sub>Н<sub>3</sub>О<sub>3</sub> в 1 мл препарату, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту С<sub>6</sub>Н<sub>9</sub>Н<sub>3</sub>О<sub>3</sub> у ФСЗ метронідазолу.

## МЕТРОНИДАЗОЛУ ТАБЛЕТКИ

### Metronidazoli tabulettae

#### METRONIDAZOLE TABLETS

Метронідазолу таблетки містять метронідазол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст метронідазолу (С<sub>6</sub>Н<sub>9</sub>Н<sub>3</sub>О<sub>3</sub>) в таблетці.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

**Розчин порівняння.** Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

**Компенсаційний розчин.** Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

**Спектральна область:** від 230 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром та інтенсивністю поглинання.

**С.** До наважки порошку таблеток, еквівалентної близько 10 мг метронідазолу, додають близько 10 мг порошку цинку Р, 1 мл води Р, 0.25 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р, нагрівають на водяній бані протягом 5 хв і охолоджують. Одержаний розчин дає реакцію на первинні ароматичні аміни (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення (2.9.3).**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 1000 мл.

*Обладнання:* прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з концентрацією близько 10 мкг/мл метронідазолу, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ метронідазолу у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією метронідазолу, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 277 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_6H_9N_3O_3$ .

*Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).* Витримують вимоги.

*Супровідні домішки.* Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин (а).* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.2 г метронідазолу, додають 5 мл суміші хлороформ Р - метанол Р (1:1), струшують протягом 5 хв, фільтрують або центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв. Використовують надосадову рідину.

*Випробовуваний розчин (b).* 1 мл випробовуваного розчину (а) доводять сумішшю хлороформ Р - метанол Р (1:1) до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння (а).* 0.1 г ФСЗ метронідазолу розчиняють у суміші хлороформ Р - метанол Р (1:1) та доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 25 мл.

*Розчин порівняння (b).* 0.5 мл розчину порівняння (а) доводять сумішшю хлороформ Р - метанол Р (1:1) до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння (c).* 5 мл розчину порівняння (b) доводять сумішшю хлороформ Р - метанол Р (1:1) до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння (d).* 1.0 мг ФСЗ 2-метил-5-нітроїмідазолу розчиняють у 2.5 мл суміші хлороформ Р - метанол Р (1:1) та додають 2.5 мл випробовуваного розчину (а).

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р.

*Рухама фаза:* хлороформ Р - диметилформамід Р - кислота мурашина Р (80:20:5).

*Проби, що наносяться:* 10 мкл; випробовувані розчини (а), (b) і розчини порівняння (а), (b), (c), (d).

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Придатність хроматографічної системи:*

- на хроматограмі розчину порівняння (d) виявляються дві чітко розділені плями;
- на хроматограмі розчину порівняння (c) чітко видна пляма.

*Нормування:*

- *одна домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину (а) додаткова пляма, розташована вище основної плями, не має перевищувати за розміром та інтенсивністю поглинання основну пляму на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.1 г метронідазолу, додають 50 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, фільтрують. 1.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* 0.100 г ФСЗ метронідазолу розчиняють у 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 277 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_6H_9N_3O_3$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_6H_9N_3O_3$  у ФСЗ метронідазолу.

## НАПРОКСЕНУ ТАБЛЕТКИ

## Naproxeni tabulettae

## NAPROXEN TABLETS

Напроксену таблетки містять напроксен.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст напроксену ( $C_{14}H_{14}O_3$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної близько 40 мг напроксену, додають 50 мл метанолу *P*, інтенсивно струшують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, перемішують і фільтрують. 10.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Метанол *P*.

*Спектральна область:* від 230 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за довжин хвиль 262 нм, 271 нм, 316 нм і 331 нм.

**B.** На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром.

## ВИПРОБУВАННЯ

## Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М фосфатний буферний розчин рН 7.4; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

0.1 М фосфатний буферний розчин рН 7.4. 2.62 г натрію дигідрофосфату моногідрату *P* і 11.50 г динатрію гідрофосфату безводного *P* розчиняють у 1000 мл води *P* і перемішують.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М фосфатним буферним розчином рН 7.4 до одержання розчину з піджою концен-

трацією напроксену, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ напроксену або USP Naproxen RS у 0.1 М фосфатному буферному розчині рН 7.4 з концентрацією напроксену, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* 1 М фосфатний буферний розчин рН 7.4.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 332 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{14}H_{14}O_3$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин (a).* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.5 г напроксену, струшують з 10 мл метанолу *P* протягом 15 хв і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

*Випробовуваний розчин (b).* 1 мл випробовуваного розчину (a) доводять метанолом *P* до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння (a).* 50 мг ФСЗ напроксену розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Розчин порівняння (b).* 0.5 мл випробовуваного розчину (a) доводять метанолом *P* до об'єму 100 мл.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $GF_{254}$  *P*.

*Рухома фаза:* кислота оцтова льодяна *P* - тетрагідрофуран *P* - толуол *P* (3:9:90).

*Проби, що наносяться:* 10 мкл; наносять випробовувані розчини (a), (b) і розчини порівняння (a), (b).

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

*Нормування:*

— *будь-яка домішка:* на хроматограмі випробовуваного розчину (a) будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %).

*Допускається наявність плями на лінії старту.*

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Випробовуваний розчин.** До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг напроксену, додають 70 мл метанолу *P*, струшують протягом 30 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, перемішують і фільтрують. 10.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 50.0 мл.

**Розчин порівняння.** 50.0 мг ФСЗ напроксену розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 50.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** Метанол *P*.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 331 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{14}H_{14}O_3$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{14}H_{14}O_3$  у ФСЗ напроксену.

**Спектральна область:** від 250 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за довжин хвиль 291 нм, 305 нм і 319 нм.

**Відношення оптичних густин:**

—  $A_{291}/A_{305}$  = від 0.61 до 0.73;

—  $A_{319}/A_{305}$  = від 0.83 до 0.96.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Мікробіологічний метод (2.7.2).

Використовують метод А.

Розраховують активність ністатину в 1 г мазі, у ОД.

## НІСТАТИНУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ

Nystatini tabulettae obductae

### NYSTATIN TABLETS COATED

Ністатину таблетки, вкриті оболонкою, містять ністатин.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Активність ністатину в таблетці.** Не менше 90.0 % і не більше 130.0 % від номінальної активності.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** До наважки порошку таблеток, що містить близько 450 000 ОД, додають 5 мл кислоти оцтової льодяної *P* та 50 мл метанолу *P*, струшують протягом 10 хв, доводять об'єм розчину метанолом *P* до 100.0 мл, фільтрують. 1.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 100.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** Метанол *P*.

**Спектральна область:** від 250 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за довжин хвиль 291 нм, 305 нм і 319 нм.

**Відношення оптичних густин:**

—  $A_{291}/A_{305}$  = від 0.61 до 0.73;

—  $A_{319}/A_{305}$  = від 0.83 до 0.96.

## НІСТАТИНУ МАЗЬ

Nystatini unguentum

### NYSTATIN OINTMENT

Ністатину мазь містить ністатин.

*Препарат має відповідати вимогам статті «М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування» і додатково підрозділу «Мазі» та наведеним нижче вимогам.*

**Активність ністатину.** Не менше 90.0 % і не більше 130.0 % від номінальної активності.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

**Випробовуваний розчин.** До наважки мазі, що містить 55 000 ОД, додають 10 мл хлороформу *P*, 40 мл метанолу *P*, струшують і фільтрують. 1.0 мл одержаного розчину доводять метанолом *P* до об'єму 25.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 1.0 мл суміші хлороформ *P* - метанол *P* (1:4) доводять метанолом *P* до об'єму 25.0 мл.



## Оксазепаму таблетки

### ВИПРОБУВАННЯ

Розпадання (2.9.1). Не більше 30 хв.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 5.0 %. 2.000 г порошку таблеток сушать при температурі 60 °С і тиску не більше 0.7 кПа протягом 3 год.

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Мікробіологічний метод (2.7.2).

Використовують метод А.

Розраховують активність ністатину в одній таблетці, у ОД.

## ОКСАЗЕПАМУ ТАБЛЕТКИ

### Oxazepam tabulettae

#### OXAZEPAM TABLETS

Оксазепаму таблетки містять оксазепам.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст оксазепаму ( $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ ) в таблетці. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

В. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром.

### ВИПРОБУВАННЯ

Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з концентрацією близько 5 мкг/мл оксазепаму, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ оксазепаму у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією оксазепаму, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 236 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробування проводять у захищеному від світла місці.*

*Випробовуваний розчин (a).* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 30 мг оксазепаму, струшують з 6 мл ацетону Р і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

*Випробовуваний розчин (b).* 2 мл випробовуваного розчину (a) доводять ацетоном Р до об'єму 10 мл.

*Розчин порівняння (a).* 10 мг ФСЗ оксазепаму розчиняють в ацетоні Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Розчин порівняння (b).* 10 мг ФСЗ оксазепаму і 10 мг ФСЗ бромазепаму розчиняють в ацетоні Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Розчин порівняння (c).* 1 мл випробовуваного розчину (a) доводять ацетоном Р до об'єму 100 мл.

*Розчин порівняння (d).* 2 мл розчину порівняння (c) доводять ацетоном Р до об'єму 10 мл.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р. Перед використанням пластинку промивають метанолом Р. Коли фронт розчинника про-

Йде 17 см від лінії старту. пластинку виймають із камери та сушать на повітрі. потім при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 30 хв.

*Рухома фаза: метанол Р - метиленхлорид Р (10:100).*

*Проби, що наносяться: 20 мкл; наносять випробовувані розчини (а), (б) і розчини порівняння (а), (б), (с), (д).*

*Відстань, яку має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.*

*Висушування: на повітрі.*

*Виявлення: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.*

*Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):*

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені плями.

*Нормування: на хроматограмі випробовуваного розчину (а) будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (с) (1.0 %); тільки одна пляма може бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (д) (0.2 %).*

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Розчини готують безпосередньо перед використанням у захищеному від світла місці.*

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг оксазепаму, додають 100 мл 96 % спирту Р, струшують протягом 30 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200.0 мл, перемішують і центрифугують. 2.0 мл надосадової рідини доводять 96 % спиртом Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* 50.0 мг ФСЗ оксазепаму розчиняють у 96 % спирті Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять 96 % спиртом Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 96 % спирт Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 230 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$  у ФСЗ оксазепаму.

## ПАРАЦЕТАМОЛУ КАПСУЛИ

### Paracetamoli capsulae

#### PARACETAMOL CAPSULES

Парацетамолу капсули містять парацетамол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст парацетамолу ( $C_8H_9NO_2$ ) в капсулі.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Спектральна область:* від 220 нм до 320 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.\*** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До наважки вмісту капсул, еквівалентної 50 мг парацетамолу, додають 25 мл метанолу Р, струшують протягом 3 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 10 мг ФСЗ парацетамолу або USP Acetaminophen RS розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р.

*Рухома фаза: метанол Р - метиленхлорид Р (20:80).*

*Проби, що наносяться: 10 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.*

*Відстань, яку має пройти рухома фаза: ¼ довжини пластинки.*

*Висушування: на повітрі.*

*Виявлення: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.*

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні осно-

## Парацетамолу капсул

вної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

### ВИПРОБУВАННЯ

#### Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* фосфатний буферний розчин рН 5.8 Р: 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* До аліквоти фільтрату, еквівалентної близько 0.75 мг парацетамолу, додають 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 257 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_8H_9NO_2$ .

*Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).* Витримують вимоги.

*Супровідні домішки.* Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Розчини готують безпосередньо перед використанням у захищеному від світла місці.*

*Випробовуваний розчин.* До наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.2 г парацетамолу, додають 8 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння (а).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 20.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 20.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 5.0 мг 4-амінофенолу Р і 5.0 мг ФСЗ парацетамолу розчиняють у метанолі Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (с).* 5.0 мг хлорацетаніліді Р розчиняють у метанолі Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 250.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октилсилільний для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 35 °С.

*Рухома фаза:* розчин 17.9 г/л динатрію гідрофосфату Р - розчин 7.8 г/л натрію дигідрофосфату Р - метанол Р, що містить 4.6 г/л розчину 400 г/л тетрабутиламонію гідроксиду Р (375:375:250).

*Швидкість рухомої фази:* 1.5 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 245 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б), (с).

*Час хроматографування:* у 12 разів більше часу утримування основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (б):

— коефіцієнт розділення: не менше 4.0 для піків 4-амінофенолу і парацетамолу.

*Нормування:*

— 4-амінофенол: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка 4-амінофенолу не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.1 %);

— хлорацетанілід: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка хлорацетаніліді не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (0.001 % (10 ppm));

— будь-яка інша домішка: площа будь-якого іншого піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.25 %).

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки вмісту капсул, еквівалентної 75 мг парацетамолу, додають 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, струшують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл, перемішують і фільтрують. До 1.0 мл одержаного розчину додають 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду та доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* 75.0 мг ФСЗ парацетамолу розчиняють у 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду та доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл. До 1.0 мл одержаного розчину додають 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду та доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 257 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_5H_5N_3O$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_5H_5N_3O$  у ФСЗ парацетамолу.

\* Використані матеріали монографії *Acetaminophen Capsules Фармакопеї США*

## ПІРАЗИНАМІДУ ТАБЛЕТКИ

### Pyrazinamidi tabulettae

#### PYRAZINAMID TABLETS

Піразинамід у таблетці містять піразинамід.

Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.

Вміст піразинамід у ( $C_5H_5N_3O$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Ультрафіолетовий спектр поглинання (2.2.25) випробовуваного розчину, приготованого для кількісного визначення, в області від 230 нм до 290 нм повинен мати максимум за довжини хвилі 268 нм.

В. Наважку порошку таблеток, еквівалентну 0.1 г піразинамід у, розчиняють у 5 мл води Р, додають 1 мл розчину заліза(II) сульфату Р2; з'являється оранжеве забарвлення, що переходить у темно-синє при додаванні 1 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р.

#### ВИПРОБУВАННЯ

Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія (2.2.25, метод стандарту).

Середовище розчинення: вода Р, 900 мл.

Обладнання: прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

Випробовуваний розчин. До аликвоти фільтрату, еквівалентної близько 0.55 мг піразинамід у, додають

0.5 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину водою Р до 50.0 мл.

Розчин порівняння. Використовують розчин порівняння, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

Компенсаційний розчин. Вода Р.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 268 нм відносно компенсаційного розчину.

Нормування: не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_5H_5N_3O$ .

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Визначення проводять розрахунково-ваговим методом.

Супровідні домішки. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.1 г піразинамід у, додають суміш метанол Р - метиленхлорид Р (1:9), витримують в ультразвуковій бані протягом 3 хв, доводять тією самою сумішшю розчинників до об'єму 10 мл, перемішують та центрифугують зі швидкістю 1500 об/хв протягом 5 хв. Використовують надосадову рідину.

Розчин порівняння (а). 0.1 г ФСЗ піразинамід у розчиняють у суміші метанол Р - метиленхлорид Р (1:9) та доводять тією самою сумішшю розчинників до об'єму 50 мл.

Розчин порівняння (б). 1 мл розчину порівняння (а) доводять сумішшю метанол Р - метиленхлорид Р (1:9) до об'єму 100 мл.

Розчин порівняння (с). 10 мг ФСЗ кислоти нікотинової розчиняють у суміші метанол Р - метиленхлорид Р (1:9), додають 5 мл розчину порівняння (а) та доводять тією самою сумішшю розчинників до об'єму 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю GF<sub>254</sub> Р.

Рухама фаза: кислота оцтова льодяна Р - вода Р - бутанол Р (20:20:60).

Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл (200 мкг) випробовуваного розчину, 20 мкл (0.4 мкг) розчину порівняння (б) та 20 мкл (20 мкг кислоти нікотинової та 20 мкг піразинамід у) розчину порівняння (с).

Відстань, яку має пройти рухама фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

— на хроматограмі мають виявлятися дві чітко розділені основні плями.

## Ранітидину таблетки, вкриті оболонкою

### Нормування:

— *будь-яка домішка*: на хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.2 %).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин*. До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.1 мг піразинаміду, додають 150 мл *води Р*, збовтують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину *водою Р* до 250.0 мл, перемішують і фільтрують. До 5.0 мл одержаного розчину додають 2 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої і доводять *водою Р* до об'єму 200.0 мл.

*Розчин порівняння*. 40.0 мг ФСЗ піразинаміду розчиняють у *воді Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до 100.0 мл. До 5.0 мл одержаного розчину додають 2 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої і доводять *водою Р* до об'єму 200.0 мл.

*Компенсаційний розчин*. Вода *Р*.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 268 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_5H_5N_3O$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_5H_5N_3O$  у ФСЗ піразинаміду.

## РАНІТИДИНУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ

### Ranitidini tabulettae obductae

#### RANITIDINE TABLETS COATED

Ранітидину таблетки, вкриті оболонкою, містять ранітидину гідрохлориду.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст ранітидину ( $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин*. Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння*. Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин*. Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область*: від 220 нм до 350 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

В. На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

С. До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.25 г ранітидину, додають 5 мл *води Р*, витримують в ультразвуковій бані протягом не більше 5 хв, фільтрують. Одержаний розчин дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

### Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення*: вода *Р*, 900 мл.

*Обладнання*: прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення*: 45 хв.

*Випробовуваний розчин*. Готують розведенням аліквоти фільтрату *водою Р* до одержання розчину з концентрацією близько 6 мкг/мл ранітидину, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння*. Готують розчин порівняння ФСЗ ранітидину гідрохлориду або USP Ranitidine Hydrochloride RS у *воді Р* з концентрацією ранітидину, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

*Компенсаційний розчин*. Вода *Р*.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 314 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування*: не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ .

Однорідність дозованих одиниць (2.9.40). Витримують вимоги.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.13 г ранітидину, додають воду Р, струшують, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл, фільтрують.

*Розчин порівняння (а).* 15 мг ФСЗ ранітидину гідрохлориду розчиняють у рухомій фазі А та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

*Розчин порівняння (б).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 200.0 мл.

*Розчин порівняння (с).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 20.0 мл. 3.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою А до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння (д).* Вміст віали ФСЗ ранітидину домішки J доводять випробовуваним розчином до об'єму 1.0 мл.

Приготування буферного розчину, рухомі фази А і В, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії *Ранітидину гідрохлорид*.

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин, розчини порівняння (а), (б), (с), (д) і рухома фаза А, як холостий розчин.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (д):

— коефіцієнт розділення: не менше 1.5 для піків домішки J і ранітидину.

*Нормування:*

- будь-яка домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.5%);
- одна домішка: на хроматограмі випробовуваного розчину площа не більше одного піка може перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (0.3%);
- інші домішки: на хроматограмі випробовуваного розчину площа не більше трьох інших піків може перевищувати 0.2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.1%).

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* До 10 таблеток додають 400 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої, струшують до повного розпадання, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл, фільтрують. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 50.0 мл.

*Розчин порівняння.* 0.17 г ФСЗ ранітидину гідрохлориду розчиняють у 0.01 М розчині кислоти хлористоводне-

вої, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 50.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 50.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 314 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{13}H_{22}N_4O_3S$  одній таблетці, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{13}H_{22}N_4O_3S$  у ФСЗ ранітидину гідрохлориду.

\* Використані матеріали монографії *Ranitidine Tablets Фармакопії США*

## РАНІТИДИНУ РОЗЧИН ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

### Ranitidini solution pro injectionibus

#### RANITIDINE INJECTION

Ранітидину розчин для ін'єкцій є стерильним розчином ранітидину гідрохлориду у воді для ін'єкцій.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст ранітидину ( $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ ).** Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у випробуванні «Супровідні домішки», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а).

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**pH** (2.2.3). Від 6.7 до 7.3.

**Супровідні домішки.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням об'єму препарату водою Р до одержання розчину з концентрацією 25 мг/мл ранітидину, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння (а).** Готують розчин порівняння ФСЗ ранітидину гідрохлориду або USP Ranitidine Hydrochloride RS у воді Р з концентрацією 560 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (б).** Готують розведенням розчину порівняння (а) водою Р до одержання розчину з концентрацією 280 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (с).** Готують розведенням розчину порівняння (а) водою Р до одержання розчину з концентрацією 140 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (д).** Готують розведенням розчину порівняння (а) водою Р до одержання розчину з концентрацією 84 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (е).** Готують розведенням розчину порівняння (а) водою Р до одержання розчину з концентрацією 28 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (ф).** Готують розведенням розчину порівняння (а) водою Р до одержання розчину з концентрацією 14 мкг/мл ранітидину гідрохлориду.

**Розчин порівняння (г).** Готують розчин порівняння ФСЗ ранітидину домішки А або USP Ranitidine Related Compound A RS у метанолі Р з концентрацією 1.27 мг/мл домішки А.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

**Рухома фаза:** етилацетат Р - 2-пропанол Р - аміаку розчин концентрований Р - вода Р (25:15:5:1).

**Проби, що наносяться:** по 10 мкл розчинів порівняння (а), (б), (с), (д), (е), (ф) і об'єм випробовуваного розчину, еквівалентний 250 мкг ранітидину; окрема проба - об'єм випробовуваного розчину, еквівалентний 250 мкг ранітидину, і поверх нього 10 мкл розчину порівняння (г).

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:** 15 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі.

**Виявлення:** пластинку витримують у парі йоду до появи плям і переглядають при денному світлі.

**Придатність хроматографічної системи:**

- на хроматограмі окремої проби, що складається з випробовуваного розчину і розчину порівняння (г), виявляються дві чітко розділені плями;
- на хроматограмі розчину порівняння (ф) чітко видна пляма.

**Нормування:**

- **одна домішка:** на хроматограмі випробовуваного розчину найбільша додаткова пляма не має перевищувати за розміром та інтенсивністю основну пляму на хроматограмі розчину порівняння (а) (2.0 %);

— **будь-яка інша домішка:** на хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка інша додаткова пляма не має перевищувати за розміром та інтенсивністю основну пляму на хроматограмі розчину порівняння (б) (1.0 %);

— **сума домішок:** на хроматограмі випробовуваного розчину сумарна інтенсивність всіх додаткових плям, крім основної плями, має бути не більше 5.0 %.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 7.00 МО/мг ранітидину.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Рідинна хроматографія (2.2.29).**

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням точного об'єму препарату рухомою фазою до одержання розчину з концентрацією 0.1 мг/мл ранітидину, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння (а).** Готують розчин порівняння ФСЗ ранітидину гідрохлориду або USP Ranitidine Hydrochloride RS у рухомій фазі з концентрацією близько 0.112 мг/мл ранітидину гідрохлориду (еквівалентно 0.100 мг/мл ранітидину).

**Розчин порівняння (б).** Готують розчин порівняння ФСЗ ранітидину гідрохлориду або USP Ranitidine Hydrochloride RS і ФСЗ ранітидину домішки С або USP Ranitidine Related Compound C RS у рухомій фазі з концентрацією близько 0.112 мг/мл ранітидину гідрохлориду і 0.01 мг/мл домішки С.

**Колонка:**

- **розмір:** 0.20 м — 0.30 м × 4.6 мм;
- **нерухома фаза:** силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р.

**Рухома фаза:** метанол Р - розчин 7.7 г/л амонію ацетату Р (85:15);

**Швидкість рухомої фази:** 2.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 322 нм.

**Інжекції:** 10 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б).

**Придатність хроматографічної системи:**

- **коефіцієнт розділення:** не менше 1.5 для піків домішки С і ранітидину на хроматограмі розчину порівняння (б);
- **ефективність колонки:** не менше 700 теоретичних тарілок на хроматограмі розчину порівняння (а);
- **коефіцієнт симетрії:** не більше 2.0 на хроматограмі розчину порівняння (а);
- **збіжність:** відповідно до вимог 2.2.46, на хроматограмі розчину порівняння (а).

Розраховують вміст  $C_{13}H_{22}N_4O_3S$  в 1 мл препарату, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту

$C_{13}H_{22}N_4O_3S$  у ФСЗ ранітидину гідрохлориду або USP Ranitidine Hydrochloride RS.

Монографія розроблена на підставі монографії Ranitidine Injection Фармакопеї США

## ФЛУОКСЕТИНУ КАПСУЛИ

### Fluoxetine capsulae

#### FLUOXETINE CAPSULES

Флуоксетину капсули містять флуоксетину гідрохлорид.

Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.

Вміст флуоксетину ( $C_{17}H_{18}F_3NO$ ) в капсулі. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Підготовка зразка:* наважку вмісту капсул, еквівалентну близько 10 мг флуоксетину, поміщають у підложку хімічну склянку, додають 10 мл метанолу Р, струшують і фільтрують. Хімічну склянку і фільтр промивають 5 мл метанолу Р. Об'єднаний фільтрат упарюють у потоці повітря і при помірному нагріванні насухо.

*Відповідність:* спектру ФСЗ флуоксетину гідрохлориду або USP Fluoxetine Hydrochloride RS.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчинення** (2.9.3).

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Середовище розчинення:* вода Р; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

*Час розчинення:* 30 хв.

*Суспензія діетиламіну фосфату.* До 250 мл ацетонітрилу Р додають 1.0 мл діетиламіну Р, перемішують і доводять рН до 3.5 кислотою фосфорною Р. Оскільки діетиламіну фосфат утворює осад, суспензію готують при інтенсивному перемішуванні.

*Випробовуваний розчин.* До 5.0 мл фільтрату додають 2.0 мл суспензії діетиламіну фосфату і перемішують.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ флуоксетину гідрохлориду або USP Fluoxetine Hydrochloride RS у воді Р з концентрацією флуоксетину, близькою до концентрації випробовуваного розчину, і фільтрують. До 5.0 мл одержаного розчину додають 2.0 мл суспензії діетиламіну фосфату і перемішують.

*Колонка:*

— розмір: 0.15 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель нітрильний для хроматографії Р1 (3 мкм – 10 мкм).

*Рухома фаза:* вода Р - ацетонітрил Р - діетиламін Р (600:400:4), рН якої доведено до 3.5 кислотою фосфорною Р. При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 2.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 226 нм.

*Інжекції:* 50 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— збіжність: відповідно до вимог 2.2.46.

*Нормування:* не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{17}H_{18}F_3NO$ .

**Однорідність дозованих одиниць** (2.9.40). Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точну наважку вмісту не менше 20 капсул, еквівалентну близько 20 мг флуоксетину, струшують з рухомою фазою, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл і перемішують.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ флуоксетину гідрохлориду або USP Fluoxetine Hydrochloride RS у рухомій фазі з концентрацією флуоксетину гідрохлориду близько 0.01 мг/мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель нітрильний для хроматографії Р1 (5 мкм).

*Буферний розчин триетиламіну:* до 10 мл триетиламіну Р додають 980 мл води Р, перемішують і доводять рН розчину до 6.0 кислотою фосфорною Р.

*Рухома фаза:* буферний розчин триетиламіну - ацетонітрил Р (65:35).

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 215 нм.



**Хлорамфеніколу капсули**

*Ін'єкції:* 10 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Час хроматографування:* не менше 22 хв.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— *ефективність колонки:* не менше 1100 теоретичних тарілок;

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст домішок методом внутрішньої нормалізації (2.2.46).

*Нормування:*

— *будь-яка домішка:* не більше 0.25 %;

— *сума домішок:* не більше 0.8 %.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точну наважку вмісту не менше 20 капсул, еквівалентну близько 10 мг флуоксетину, струшують з рухомою фазою, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ флуоксетину гідрохлориду або USP Fluoxetine Hydrochloride RS у рухомій фазі з концентрацією флуоксетину гідрохлориду 0.11 мг/мл.

*Колонка:*

— *розмір:* 0.25 м × 4.6 мм;

— *нерухома фаза:* силікагель октилсилільний, деактивований відносно основ, для хроматографії Р (5 мкм).

*Буферний розчин триетиламіну:* готують, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки».

*Рухома фаза:* буферний розчин триетиламіну - тетрагідрофуран Р - метанол Р (6:3:1). При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 227 нм.

*Ін'єкції:* 10 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— *коефіцієнт симетрії:* не більше 2.0;

— *збіжність:* відповідно до вимог 2.2.46.

Розраховують вміст  $C_{17}H_{18}F_3NO$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_{17}H_{18}F_3NO$  у ФСЗ флуоксетину гідрохлориду.

Монографія розроблена на підставі монографії Fluoxetine Capsules Фармакопеї США

**ХЛОРАМФЕНІКОЛУ КАПСУЛИ****Chloramphenicoli capsulae****CHLORAMPHENICOL CAPSULES**

Хлорамфеніколу капсули містять хлорамфенікол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Капсули» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ) в капсулі. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

*Випробовуваний розчин.* До наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.1 г хлорамфеніколу, додають 5 мл 96 % спирту Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину 96 % спиртом Р до 10 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у 96 % спирті Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії Хлорамфенікол, з такими змінами:

*Проби, що наносяться:* 1 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**С.** Наважку вмісту капсул, еквівалентну 50 мг хлорамфеніколу, поміщають у фарфоровий тигель і додають 0.5 г натрію карбонату безводного Р, натрі-

вають на відкритому полум'ї протягом 10 хв і охолоджують. Одержаний залишок змішують із 5 мл кислоти азотної розведеної Р і фільтрують. До 1 мл одержаного фільтрату додають 1 мл води Р. Одержаний розчин дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

## ВИПРОБУВАННЯ

### Розчинення (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

Середовище розчинення: 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

Обладнання: прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату водою Р до одержання розчину з концентрацією близько 10 мкг/мл хлорамфеніколу, розрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* 50 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої, доводять об'єм розчину 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 85 % (Q) від номінального вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ .

*Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).* Витримують вимоги.

**2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки вмісту капсул, еквівалентної 40 мг хлорамфеніколу, додають 100 мл рухомої фази, струшують протягом 10 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 200.0 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 5.0 мг ФСЗ 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл.

*Колонка:*

— розмір: 0.1 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсильний ендкепований для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* розчин 2.1 г/л натрію пентансульфонату Р - ацетонітрилу Р - кислота оцтова льодяна Р (85:15:1).

*Швидкість рухомої фази:* 2.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 272 нм.

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Нормування:*

— 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки вмісту капсул, еквівалентної 0.1 г хлорамфеніколу, додають 300 мл води Р, нагрівають на теплій водяній бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи, охолоджують, доводять об'єм розчину водою Р до 500.0 мл, відстоюють протягом 30 хв. 10.0 мл одержаного прозорого розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* До 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу додають 300 мл води Р, нагрівають на теплій водяній бані до повного розчинення, охолоджують, доводять об'єм розчину водою Р до 500.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в одній капсулі, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту капсули, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу.

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ ТАБЛЕТКИ

### Chloramphenicoli tabulettae

#### CHLORAMPHENICOL TABLETS

Хлорамфеніколу таблетки містять хлорамфенікол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ) в таблетці. Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).**

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).**

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.1 г хлорамфеніколу, додають 5 мл 96 % спирту Р, струшують протягом 5 хв, доводять об'єм розчину 96 % спиртом Р до 10 мл, перемішують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у 96 % спирті Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Супровідні домішки» монографії Хлорамфенікол, з такими змінами:

*Проби, що наносяться:* 1 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**С.** Наважку порошку таблеток, еквівалентну 50 мг хлорамфеніколу, поміщають у фарфоровий тигель і додають 0.5 г натрію карбонату безводного Р, нагрівають на відкритому полум'ї протягом 10 хв і охолоджують. Одержаний залишок змішують із 5 мл кислоти азотної розведеної Р і фільтрують. До 1 мл одержаного фільтрату додають 1 мл води Р. Одержаний розчин дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Розчинення (2.9.3).**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

*Обладнання:* прилад 1, швидкість обертання 100 об/хв.

*Час розчинення:* 45 хв.

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням аліквоти фільтрату водою Р до одержання розчину з концентрацією близько 10 мкг/мл хлорамфеніколу, зрахованою відносно номінального вмісту.

*Розчин порівняння.* 50 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять об'єм розчину 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

*Нормування:* не менше 75 % (Q) від номінального вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До наважки порошку таблеток, еквівалентної 40 мг хлорамфеніколу, додають 100 мл рухомої фази, струшують протягом 10 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 200.0 мл, перемішують і фільтрують.

Приготування розчину порівняння, рухома фаза, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол» монографії Хлорамфеніколу капсули.

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Нормування:*

— 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 0.1 г хлорамфеніколу, додають 300 мл води Р, нагрівають на теплій водяній бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи, охолоджують, доводять об'єм розчину водою Р до 500.0 мл, відстоюють протягом 30 хв. 10.0 мл одержаного прозорого розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* До 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу додають 300 мл води Р, нагрівають на теплій водяній

бані до повного розчинення, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* до 500.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин. Вода Р.*

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу.

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ КРАПЛІ ОЧНІ, РОЗЧИН

### Chloramphenicoli guttae ophthalmicae, solutio

#### CHLORAMPHENICOL EYE DROPS, SOLUTION

Хлорамфеніколу краплі очні, розчин є стерильним розчином хлорамфеніколу у воді очищеній.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Очні лікарські засоби» та додатково підрозділу «Очні краплі» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ).** Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у випробуванні «2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол», час утримування основного піка

має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**рН (2.2.3).** Від 4.0 до 7.5.

**2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 50 мг хлорамфеніколу, доводять рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (a).* 4.0 мг ФСЗ 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 50 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

Рухома фаза, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол» монографії *Хлорамфеніколу капсули*, з такими змінами:

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (a), (b).

*Нормування:*

— 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a).

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 50 мг хлорамфеніколу, доводять *водою Р* до 250.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* До 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу додають 300 мл *води Р*, нагрівають на теплій водяній бані до повного розчинення, охолоджують, доводять об'єм розчину *водою Р* до 500.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин. Вода Р.*

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в 1 мл препарату, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу.

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ КРАПЛІ ВУШНІ, РОЗЧИН

### Chloramphenicoli guttae auriculariae. solutio

#### CHLORAMPHENICOL EAR DROPS, SOLUTION

Хлорамфеніколу краплі вушні, розчин є розчином хлорамфеніколу у підходящому розчиннику.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Вушні лікарські засоби» та додатково підрозділам «Вушні краплі та спреї», «Вушні краплі» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ). Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**B.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаний у випробуванні «2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол», час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**pH\*** (2.2.3). Від 4.0 до 8.0. Вимірюють рН препарату, розведеного рівним об'ємом води Р.

**2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 50 мг хлорамфеніколу, доводять рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (a).* 5.0 мг ФСЗ 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу розчиняють у рухомій

фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

*Розчин порівняння (b).* 50 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

Рухома фаза, умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «2-Аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол» монографії *Хлорамфеніколу капсули*, з такими змінами:

*Інжекції:* 20 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (a), (b).

*Нормування:*

— 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діол: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна 2-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропан-1,3-діолу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a).

**Вода** (2.5.12). Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 1.0 мл препарату.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 50 мг хлорамфеніколу, доводять водою Р до 250.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* До 0.1 г ФСЗ хлорамфеніколу додають 300 мл води Р, нагрівають на теплій водяній бані до повного розчинення, охолоджують, доводять об'єм розчину водою Р до 500.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в 1 мл препарату, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу.

\* Використані матеріали монографії *Chloramphenicol Otic Solution Фармакопεί США*

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ ПОРОШОК ДЛЯ КРАПЕЛЬ ОЧНИХ

### Chloramphenicolum pro guttae ophthalmicae

#### CHLORAMPHENICOL FOR EYE DROPS

Хлорамфеніколу порошок для крапель очних є стерильною сухою сумішшю хлорамфеніколу та однієї або більше допоміжних речовин, вміщеною у герметично закупорений контейнер.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Очні лікарські засоби» та додатково підрозділу «Порошки для приготування очних крапель і примочок» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ). Не менше 90.0 % і не більше 130.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаний при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

#### ВИПРОБУВАННЯ

**pH (2.2.3).** Від 7.1 до 7.5. Вимірюють pH водного розчину препарату із концентрацією 5 мг/мл хлорамфеніколу.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Готують розведенням вмісту одного контейнера з препаратом рухомою фазою до одержання розчину з концентрацією 100 мкг/мл хлорамфеніколу. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Розчин порівняння.* Готують розчин порівняння ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS у рухомій фазі з концентрацією близько 100 мкг/мл хлорамфеніколу. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Колонка:*

— розмір: 0.1 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* вода Р - метанол Р - кислота оцтова льодяна Р (55:45:0.1). При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— коефіцієнт симетрії: не більше 2.0;

— ефективність колонки: не менше 1800 теоретичних тарілок;

— збіжність: відносне стандартне відхилення не більше 1.0 %.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у одному контейнері, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS.

*Монографія розроблена на підставі монографії Chloramphenicol for Ophthalmic Solution Фармакопеї США*

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ МАЗЬ ОЧНА

### Chloramphenicoli ophthalmicae unguentum

#### CHLORAMPHENICOL EYE OINTMENT

Хлорамфеніколу мазь очна є стерильною маззю, що містить хлорамфенікол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Очні лікарські засоби» та додатково підрозділу «Очні м'які лікарські засоби» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ). Не менше 90.0 % і не більше 130.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаний при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Точну наважку мазі, еквівалентну 25 мг хлорамфеніколу, поміщають у конічну колбу, додають 20 мл циклогексану Р, перемішують

і витримують в ультразвуковій бані протягом 2 хв. Потім додають 60 мл *метанолу Р*, перемішують і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Фільтр промивають *метанолом Р*, збираючи метанол у ту саму мірну колбу, доводять об'єм розчину *метанолом Р* до 100.0 мл. 50.0 мл одержаного розчину поміщають у крутлодонну колбу, випарюють до сухого залишку під вакуумом на водній бані при температурі близько 35 °С. Розчиняють залишок у 50.0 мл *метанолу Р*. 10.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Розчин порівняння.* 25 мг ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS розчиняють у *метанолі Р*, доводять об'єм розчину *метанолом Р* до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл, перемішують. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Колонка:*

— *розмір:* 0.1 м × 4.6 мм;

— *нерухома фаза:* силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* вода Р - метанол Р - кислота оцтова льодяна Р (55:45:0.1). При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

— *коефіцієнт симетрії:* не більше 2.0;

— *ефективність колонки:* не менше 1800 теоретичних тарілок;

— *збіжність:* відносне стандартне відхилення не більше 1.0 %.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в 1 г мазі, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS.

*Монографія розроблена на підставі монографії Chloramphenicol Ophthalmic Ointment Фармакопеї США*

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ КРЕМ

### Chloramphenicol cream

#### CHLORAMPHENICOL CREAM

Хлорамфеніколу крем містить хлорамфенікол.

*Препарат має відповідати вимогам статті «М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування» та додатково підрозділу «Креми» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст хлорамфеніколу ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ).** Не менше 90.0 % і не більше 130.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* До точної наважки крему, еквівалентної 40 мг хлорамфеніколу, додають 80 мл *метанолу Р*, витримують в ультразвуковій бані протягом 10 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину *метанолом Р* до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Розчин порівняння.* 40 мг ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS розчиняють у *метанолі Р*, доводять об'єм розчину *метанолом Р* до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл. Фільтрують аликвоту одержаного розчину крізь фільтр з діаметром пор 0.5 мкм або менше і використовують прозору рідину.

*Колонка:*

— *розмір:* 0.1 м × 4.6 мм;

— *нерухома фаза:* силікагель октадецилсилільний для хроматографії Р (5 мкм).

*Рухома фаза:* вода Р - метанол Р - кислота оцтова льодяна Р (55:45:0.1). При необхідності коригують.

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв.

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

*Інжекції:* 10 мкл; випробовуваний розчин і розчин порівняння.

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння:

- *коефіцієнт симетрії:* не більше 2.0;
- *ефективність колонки:* не менше 1800 теоретичних тарілок;
- *збіжність:* відносне стандартне відхилення не більше 1.0 %.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в 1 г крему, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу або USP Chloramphenicol RS.

*Монографія розроблена на підставі монографії Chloramphenicol Creat Фармакопеї США*

## ХЛОРАМФЕНІКОЛУ НАТРІЮ СУКЦИНАТУ ПОРОШОК ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Chloramphenicoli natrii succinatis pro  
injectionibus

### CHLORAMPHENICOL SODIUM SUCCINATE FOR INJECTION

Хлорамфеніколу натрію сукцинату порошок для ін'єкцій є стерильним порошком хлорамфеніколу натрію сукцинату, вміщеним у герметично закупорений контейнер.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Лікарські засоби для парентерального застосування» та додатково підрозділу «Порошки для приготування ін'єкційних або внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів» та наведеним нижче вимогам.*

Вміст хлорамфеніколу натрію сукцинату, у перерахунку на хлорамфенікол ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ) в контейнері. Не менше 90.0 % і не більше 110.0 % від номінального вмісту.

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 220 нм до 400 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння.

**B.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Визначають масу вмісту 10 контейнерів (2.9.5) і змішують вміст цих 10 контейнерів.

*Випробовуваний розчин.* Наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, еквівалентну 0.1 г хлорамфеніколу, розчиняють у ацетоні Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Приготування розчинів порівняння (а) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Ідентифікація А» монографії Хлорамфеніколу натрію сукцинату.

*Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 основні плями на рівні 2 основних плям на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідні їм за розміром; їх розташування має відрізнятися від розташуванням основної плями на хроматограмі розчину порівняння (b).

**C.** Близько 10 мг змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», розчиняють в 1 мл спирту (50 % об/об) Р, додають 3 мл розчину 10 г/л кальцію хлориду Р і 50 мг цинку порошку Р і нагрівають на водяній бані протягом 10 хв. Одержаний гарячий розчин фільтрують, охолоджують, додають 0.1 мл бензоїлхлориду Р і струшують протягом 1 хв. Потім додають 0.5 мл розчину заліза(III) хлориду Р і 2 мл хлороформу Р і струшують; верхній шар набуває світло-фіолетово-червоного або пурпурового забарвлення.

**D.** Препарат дає реакцію (а) на натрій (2.3.1).

### ВИПРОБУВАННЯ

**pH** (2.2.3). Від 6.4 до 7.0. 2.5 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**Однорідність дозованих одиниць** (2.9.40). Витримує вимоги.

**Хлорамфенікол і хлорамфенікол динатрію дисукцинат.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

Приготування розчинів порівняння (а) і (b), рухома фаза та умови хроматографування, як зазначено у випробуванні «Хлорамфенікол і хлорамфенікол динатрію дисукцинат» монографії Хлорамфеніколу натрію сукцинату, із такими змінами:

*Випробовуваний розчин.* Наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентну 25 мг хлорамфеніколу,



**Хлорпромазину таблетки, вкриті оболонкою**

розчиняють у рухомій фазі, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

*Розчин порівняння (с).* Наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентну 25 мг хлорамфеніколу, розчиняють у рухомій фазі, додають 5.0 мл розчину А та 5.0 мл розчину В і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100.0 мл.

*Інжеції:* 20 мкл: випробовуваний розчин і розчини порівняння (а), (б), (с).

*Придатність хроматографічної системи:* розчин порівняння (с):

— 2 відповідних піки на хроматограмах розчинів порівняння (а) і (б) мають бути чітко розділені із 2 основними піками на хроматограмі випробовуваного розчину; якщо необхідно коригують вміст метанолу в рухомій фазі.

*Нормування:*

— *хлорамфенікол:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна хлорамфеніколу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (2.0 %);

— *хлорамфенікол динатрію дисукцинат:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка, відповідна хлорамфеніколу динатрію дисукцинату, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (б) (2.0 %).

**Вода (2.5.12).** Не більше 2.0 %. Визначення проводять із 0.5 г змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В».

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14).** Менше 0.2 МО/мг хлорамфеніколу.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Випробовуваний розчин.* Точну наважку змішаного вмісту 10 контейнерів, одержаного у випробуванні «Ідентифікація В», еквівалентну 0.2 г хлорамфеніколу, розчиняють у воді Р, доводять об'єм розчину водою Р до 500.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Розчин порівняння.* 80 мг ФСЗ хлорамфеніколу розчиняють у воді Р, доводять об'єм розчину водою Р до 200.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 276 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  в одному контейнері, у міліграмах, у перерахунку на середню масу вмісту контейнера, виходячи із заявленого вмісту  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  у ФСЗ хлорамфеніколу.

**ХЛОРПРОМАЗИНУ ТАБЛЕТКИ, ВКРИТІ ОБОЛОНКОЮ****Chlorpromazini tabulettae obductae****CHLORPROMAZINE TABLETS COATED**

Хлорпромазину таблетки, вкриті оболонкою, містять хлорпромазину гідрохлорид.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст хлорпромазину гідрохлориду ( $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$ ) в таблетці.** Не менше 92.5 % і не більше 107.5 % від номінального вмісту.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ**

**А.** Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25).

*Випробовуваний розчин.* Використовують випробовуваний розчин, приготований для кількісного визначення.

*Розчин порівняння.* Використовують розчин порівняння, приготований для кількісного визначення.

*Компенсаційний розчин.* Використовують компенсаційний розчин, зазначений у розділі «Кількісне визначення».

*Спектральна область:* від 230 нм до 340 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину повинен мати максимуми за тих самих довжин хвиль, що і розчин порівняння.

**В.** Ідентифікація фенотіазинів методом тонкошарової хроматографії (2.3.3) з такими змінами.

*Випробовуваний розчин.* Наважку порошку таблеток, еквівалентну 20 мг хлорпромазину гідрохлориду, струщують з 10 мл хлороформу Р і центрифугують. Використовують прозору надосадову рідину.

*Розчин порівняння.* 20 мг ФСЗ хлорпромазину гідрохлориду розчиняють у хлороформі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

**ВИПРОБУВАННЯ**

**Розчинення (2.9.3).**

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

*Середовище розчинення:* 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, 900 мл.

*Обладнання:* прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

Час розчинення: 30 хв.

**Випробовуваний розчин.** Готують розведенням аліквоти фільтрату 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з концентрацією близько 5 мкг/мл хлорпромазину гідрохлориду, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння.** Готують розчин порівняння ФСЗ хлорпромазину гідрохлориду у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією хлорпромазину гідрохлориду, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

**Компенсаційний розчин.** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 254 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробування проводять у захищеному від світла місці; розчини готують безпосередньо перед використанням.**

**Випробовуваний розчин.** Наважку порошку попередньо звільнених від оболонки таблеток, еквівалентну 0.1 г хлорпромазину гідрохлориду, струшують з 10 мл суміші діетиламін Р - метанол Р (5:95) і фільтрують.

**Розчин порівняння.** 1 мл випробовуваного розчину доводять сумішню діетиламін Р - метанол Р (5:95) до об'єму 200 мл.

**Тонкий шар:** силікагель GF<sub>254</sub> Р.

**Рухома фаза:** ацетон Р - діетиламін Р - циклогексан Р (10:10:80).

**Проби, що наносяться:** 10 мкл; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:** 12 см від лінії старту.

**Висушування:** на повітрі протягом 15 хв.

**Виявлення:** в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

**Нормування:**

— **будь-яка домішка:** на хроматограмі випробовуваного розчину (а) будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.5 %). Не враховують пляму на лінії старту.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Випробування проводять у захищеному від світла місці; розчини готують безпосередньо перед використанням.**

**Випробовуваний розчин.** Порошок 10 таблеток розтирають з 10 мл етанолу Р, кількісно переносять одержану суміш 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої у мірну колбу місткістю 500 мл, додають 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої до об'єму близько 300 мл і струшують протягом 15 хв. Доводять об'єм розчину 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки, перемішують і фільтрують. Об'єм фільтрату, еквівалентний 5 мг хлорпромазину гідрохлориду, доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100.0 мл. 10.0 мл одержаного розчину доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння.** 50.0 мг ФСЗ хлорпромазину гідрохлориду розчиняють у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму 100.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 254 нм відносно компенсаційного розчину.

Розраховують вміст  $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$  в одній таблетці, у міліграмах, виходячи із заявленого вмісту  $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$  у ФСЗ хлорпромазину гідрохлориду.

## ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ ТАБЛЕТКИ

### Ciprofloxacin tabulettae

#### CIPROFLOXACIN TABLETS

Ципрофлоксацину таблетки містять ципрофлоксацину гідрохлорид.

*Препарат має відповідати вимогам статті «Таблетки» та наведеним нижче вимогам.*

**Вміст ципрофлоксацину ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ) в таблетці.** Не менше 95.0 % і не більше 105.0 % від номінального вмісту.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

**Випробовуваний розчин.** Використовують випробовуваний розчин, приготований для визначення супровідних домішок і кількісного визначення.

## Ципрофлоксацину таблетки

**Розчин порівняння.** 20 мг ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину водою Р до 50.0 мл.

**Пластинка:** ТШХ пластинка із шаром силікагелю  $F_{254}$  Р.

**Рухома фаза:** ацетонітрил Р - розчин аміаку концентрований Р - метиленхлорид Р - метанол Р (10:20:40:40).

**Проби, що наносяться:** 10 мкл, смугами; наносять випробовуваний розчин і розчин порівняння.

**Відстань, яку має пройти рухома фаза:** до кінця пластинки.

**Висушування:** на повітрі протягом 15 хв.

**Виявлення:** УФ-світлі за довжин хвиль 254 нм і 365 нм.

**Результати:** на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна зона на рівні основної зони на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

**В.** На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній при кількісному визначенні, час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а).

### ВИПРОБУВАННЯ

#### Розчинення\* (2.9.3).

Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області (2.2.25, метод стандарту).

**Середовище розчинення:** 0.01 М розчин кислоти хлористоводневої; 900 мл.

**Обладнання:** прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

**Час розчинення:** 30 хв.

**Випробовуваний розчин.** Використовують фільтрат або готують розведенням аліквоти фільтрату 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої до одержання розчину з підходящою концентрацією ципрофлоксацину, розрахованою відносно номінального вмісту.

**Розчин порівняння.** Готують розчин порівняння ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду або USP Ciprofloxacin Hydrochloride RS у 0.01 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією ципрофлоксацину, близькою до концентрації випробовуваного розчину.

**Компенсаційний розчин.** 0.01 М розчин кислоти хлористоводневої.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за довжини хвилі 276 нм відносно компенсаційного розчину.

**Нормування:** не менше 80 % (Q) від номінального вмісту  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ .

**Однорідність дозованих одиниць (2.9.40).** Витримують вимоги.

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 2.0 г ципрофлоксацину, додають 700 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані протягом 20 хв, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 1000.0 мл, перемішують і фільтрують. 5.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 20.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** 29 мг ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 5 мг ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду для ідентифікації піка (що містить домішки В, С, D і Е) розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

**Розчин порівняння (с).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл (вихідний розчин). До 1.0 мл вихідного розчину додають 1.0 мл рухомої фази.

**Розчин порівняння (d).** 2.0 мл вихідного розчину, одержаного при приготуванні розчину порівняння (с), доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель октадецилсилільний, деактивований відносно основ, для хроматографії Р (5 мкм);

— температура: 40 °С.

**Рухома фаза:** ацетонітрил Р - розчин 2.45 г/л кислоти фосфорної Р, рН якого попередньо доводять до 3.0 триетиламіном Р (13:87).

**Швидкість рухомої фази:** 1.5 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 278 нм.

**Інжекції:** 10 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (b), (с), (d).

**Час хроматографування:** у 2 рази більше часу утримування ципрофлоксацину.

**Відносні часи утримування** до ципрофлоксацину (час утримування ципрофлоксацину близько 9 хв): домішки Е — близько 0.4; домішки F — близько 0.5; домішки В — близько 0.6; домішки С — близько 0.7; домішки D — близько 1.2.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (b):

— коефіцієнт розділення: не менше 1.3 для піків домішки В і домішки С.

**Нормування:**

— поправкові коефіцієнти: для розрахунку вмісту домішок В, С, D і Е площу відповідного піка множать на поправковий коефіцієнт, що дорівнює:

- для домішки В — 0.7; для домішки С — 0.6; для домішки D — 1.4; для домішки E — 6.7; використовують хроматограму розчину порівняння (b);
- *домішка С*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки С не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.5 %);
  - *домішка E*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки E не має перевищувати 1.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.3 %);
  - *будь-яка інша домішка*: на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого іншого піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.2 %);
  - *сума домішок*: на хроматограмі випробовуваного розчину сума площ усіх будь-яких інших піків не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.5 %);
  - *не враховують*: піки, площа яких менше 0.1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.05 %).

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29), як зазначено в розділі «Супровідні домішки», із такими змінами.

*Інжекції*: 10 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння (a).

Розраховують вміст  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  в одній таблетці, у міліграмах, у перерахунку на середню масу таблетки, виходячи із заявленого вмісту  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  у ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду.

---

\* Використані матеріали монографії *Ciprofloxacin Tablets Фармакопеї США*



## ЗАГАЛЬНИЙ ЗМІСТ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ 1 ВИДАННЯ

Для зручності користування загальний зміст включає посилання на том ДФУ, що містить останню версію відповідної статті. Наприклад,

Дигітоксин ..... 1.1 - 322

означає, що остання версія монографії на *Дигітоксин* знаходиться у Доповненні I на с. 322.

Основний том ДФУ позначено 1.0.

I.	РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ .....	1.0 - 1
II.	СЕКРЕТАРІАТ РЕДАКЦІЙНОЇ КОЛЕГІЇ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ.....	1.4 - 17
III.	ВІДПОВІДАЛЬНІ ОСОБИ .....	1.4 - 19
IV.	ОРГАНІЗАЦІ ТА УСТАНОВИ УКРАЇНИ, ЩО БРАЛИ УЧАСТЬ У РОЗРОБЦІ ДОПОВНЕННЯ ДО ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ.....	1.4 - 21
VI.	ВСТУП.....	1.4 - 25
VII.	ДОДАТКИ ДО ДІЮЧИХ ТЕКСТІВ ДФУ.....	1.4 - 27

### ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ

1.	ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ .....	1.2 - 33
1.1.	ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ.....	1.2 - 33
1.2.	ІНШІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ПОШИРЮЮТЬСЯ НА ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ Й МОНОГРАФІЇ .....	1.2 - 34
1.3.	ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ.....	1.2 - 35
1.4.	МОНОГРАФІЇ.....	1.2 - 35
1.5.	СКОРОЧЕННЯ ТА ПОЗНАЧЕННЯ .....	1.2 - 39
1.6.	ОДИНИЦІ МІЖНАРОДНОЇ СИСТЕМИ (СИ), ВИКОРИСТОВУВАНІ У ФАРМАКОПЕЇ, І ЇХНЯ ВІДПОВІДНІСТЬ ІНШИМ ОДИНИЦЯМ.....	1.2 - 40
2.	МЕТОДИ АНАЛІЗУ	
2.1.	ОБЛАДНАННЯ	
2.1.1.	Краплеміри .....	1.2 - 45
2.1.2.	Порівняльна таблиця пористості скляних фільтрів .....	1.0 - 13
2.1.3.	Ультрафіолетові лампи для аналітичних цілей .....	1.4 - 35
2.1.4.	Сита.....	1.0 - 14
2.1.5.	Пробірки для порівняльних випробувань.....	1.2 - 45
2.1.6.	Індикаторні трубки.....	1.4 - 35
2.2.	ФІЗИЧНІ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ	
2.2.1.	Визначення прозорості і ступеня каламутності рідин .....	1.4 - 37
2.2.2.	Визначення ступеня забарвлення рідин .....	1.0 - 15
2.2.3.	Потенціометричне визначення рН.....	1.2 - 46
2.2.4.	Залежність між реакцією розчину, приблизним значенням рН і кольором індикаторів.....	1.2 - 47
2.2.5.	Відносна густина .....	1.3 - 23

2.2.6.	Показник заломлення (індекс рефракції).....	1.2 - 47
2.2.7.	Оптичне обертання .....	1.2 - 49
2.2.8.	В'язкість .....	1.0 - 23
2.2.9.	Метод капілярної віскозиметрії.....	1.0 - 23
2.2.10.	Метод ротаційної віскозиметрії.....	1.0 - 24
2.2.11.	Температурні межі перегонки .....	1.0 - 25
2.2.12.	Температура кипіння .....	1.1 - 9
2.2.13.	Температура кипіння .....	1.0 - 26
2.2.13.	Визначення води методом відгону .....	1.0 - 27
2.2.14.	Температура плавлення — капілярний метод.....	1.0 - 27
2.2.15.	Температура плавлення — відкритий капілярний метод .....	1.2 - 50
2.2.16.	Температура плавлення — метод миттєвого плавлення.....	1.0 - 28
2.2.17.	Температура краплепадіння .....	1.0 - 28
2.2.18.	Температура тверднення.....	1.0 - 29
2.2.19.	Амперометричне титрування.....	1.0 - 30
2.2.20.	Потенціометричне титрування.....	1.4 - 39
2.2.21.	Флуориметрія .....	1.1 - 9
2.2.22.	Атомно-емісійна спектрометрія .....	1.3 - 24
2.2.23.	Атомно-абсорбційна спектрометрія.....	1.3 - 27
2.2.24.	Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області .....	1.0 - 34
2.2.25.	Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях .....	1.2 - 50
2.2.26.	Хроматографія на папері.....	1.1 - 9
2.2.27.	Тонкошарова хроматографія .....	1.2 - 56
2.2.28.	Газова хроматографія .....	1.2 - 59
2.2.29.	Рідинна хроматографія .....	1.2 - 60
2.2.30.	Ексклюзивна хроматографія.....	1.2 - 62
2.2.31.	Електрофорез .....	1.1 - 12
2.2.32.	Втрата в масі при висушуванні .....	1.4 - 39
2.2.33.	Спектрометрія ядерного магнітного резонансу.....	1.1 - 18
2.2.34.	Термічний аналіз .....	1.4 - 40
2.2.35.	Осмоляльність .....	1.0 - 50
2.2.36.	Потенціометричне визначення концентрації іонів із використанням іонселективних електродів .....	1.1 - 20
2.2.37.	Рентгенофлуоресцентна спектрометрія.....	1.3 - 31
2.2.38.	Питома електропровідність .....	1.1 - 22
2.2.39.	Молекулярно-масовий розподіл декстранів .....	1.1 - 23
2.2.40.	Спектрометрія у ближній інфрачервоній області спектра .....	1.2 - 67
2.2.41.	Круговий дихроїзм .....	1.4 - 43
2.2.42.	Густина твердих речовин .....	1.4 - 45
2.2.43.	Мас-спектрометрія.....	1.2 - 73
2.2.44.	Визначення вмісту загального органічного вуглецю у воді для фармацевтичного використання.....	1.1 - 26
2.2.45.	Надкритична хроматографія.....	1.2 - 77
2.2.46.	Методи хроматографічного розділення .....	1.3 - 32
2.2.48.	Раманівська спектрометрія.....	1.4 - 46
2.2.49.	Вимірювання в'язкості на віскозиметрі з падаючою кулькою .....	1.4 - 48
2.2.54.	Ізоелектрофокусування .....	1.4 - 48
2.2.55.	Пептидне картування.....	1.4 - 51
2.2.60.	Температура плавлення — інструментальний метод.....	1.3 - 41
2.2.N.1.	Титрування у неводних розчинниках.....	1.0 - 51
2.2.N.2.	Валідація аналітичних методик і випробувань .....	1.2 - 85

### 2.3. ІДЕНТИФІКАЦІЯ

2.3.1.	Реакції ідентифікації на іони і функціональні групи.....	1.0 - 68
2.3.2.	Ідентифікація жирних олій методом тонкошарової хроматографії.....	1.3 - 43
2.3.3.	Ідентифікація фенотіазинів методом тонкошарової хроматографії.....	1.0 - 74
2.3.4.	Визначення запаху .....	1.0 - 74

### 2.4. ВИПРОБУВАННЯ НА ГРАНИЧНИЙ ВМІСТ ДОМІШОК

2.4.1.	Амонію солі .....	1.0 - 75
2.4.2.	Арсен .....	1.0 - 75

2.4.3.	Кальцій .....	1.0 - 76
2.4.4.	Хлориди .....	1.0 - 76
2.4.5.	Фториди .....	1.0 - 77
2.4.6.	Магній .....	1.0 - 77
2.4.7.	Магній і лужноземельні метали .....	1.0 - 77
2.4.8.	Важкі метали .....	1.4 - 56
2.4.9.	Залізо .....	1.0 - 80
2.4.10.	Свинець у цурках .....	1.0 - 80
2.4.11.	Фосфати .....	1.0 - 80
2.4.12.	Калій .....	1.0 - 80
2.4.13.	Сульфати .....	1.0 - 81
2.4.14.	Сульфатна зола .....	1.4 - 60
2.4.15.	Нікель у поліолах .....	1.0 - 81
2.4.16.	Загальна зола .....	1.0 - 81
2.4.17.	Алюміній .....	1.0 - 82
2.4.18.	Вільний формальдегід .....	1.0 - 82
2.4.19.	Лужні домішки у жирних оліях .....	1.0 - 82
2.4.20.	Антиоксиданти у жирних оліях .....	1.0 - 83
2.4.21.	Сторонні олії у жирних оліях методом тонкошарової хроматографії .....	1.0 - 84
2.4.22.	Сторонні олії у жирних оліях методом газової хроматографії .....	1.0 - 85
2.4.23.	Стерини у жирних оліях .....	1.0 - 88
2.4.24.	Ідентифікація залишкових розчинників і контроль їх кількостей .....	1.1 - 27
2.4.25.	Залишкові кількості етиленоксиду і діоксану .....	1.0 - 90
2.4.26.	<i>N,N</i> -диметиланілін .....	1.0 - 91
2.4.27.	Важкі метали у препаратах рослинного походження і жирних оліях .....	1.2 - 102
2.4.28.	2-Етилгексанова кислота .....	1.0 - 92
2.4.N.1.	Цинк .....	1.0 - 93
2.4.N.2.	Речовини, що легко обвуглюються .....	1.0 - 93

## 2.5. МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

2.5.1.	Кислотне число .....	1.0 - 94
2.5.2.	Ефірне число .....	1.0 - 94
2.5.3.	Гідроксильне число .....	1.0 - 94
2.5.4.	Йодне число .....	1.1 - 34
2.5.5.	Перекисне число .....	1.0 - 96
2.5.6.	Число омилення .....	1.0 - 97
2.5.7.	Неомилювані речовини .....	1.0 - 97
2.5.8.	Визначення амінного азоту у сполуках, що містять первинну ароматичну аміногрупу .....	1.1 - 34
2.5.9.	Визначення азоту після мінералізації сірчаною кислотою .....	1.0 - 98
2.5.10.	Метод спалювання у колбі з киснем .....	1.1 - 35
2.5.11.	Комплексометричне титрування .....	1.0 - 98
2.5.12.	Визначення води напівмікрометодом (метод К. Фішера) .....	1.0 - 99
2.5.13.	Алюміній в адсорбованих вакцинах .....	1.2 - 104
2.5.14.	Кальцій в адсорбованих вакцинах .....	1.2 - 104
2.5.15.	Фенол у імуносироватках і вакцинах .....	1.2 - 104
2.5.16.	Протеїн у полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 104
2.5.17.	Нуклеїнові кислоти в полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 104
2.5.18.	Фосфор у полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 105
2.5.19.	<i>O</i> -Ацетил у полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 105
2.5.20.	Гексозаміни в полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 105
2.5.21.	Метилпентози в полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 106
2.5.22.	Уронові кислоти в полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 106
2.5.23.	Сіалова кислота в полісахаридних вакцинах .....	1.2 - 107
2.5.24.	Діоксид вуглецю в газах .....	1.4 - 61
2.5.25.	Оксид вуглецю в газах .....	1.4 - 61
2.5.26.	Оксид і діоксид азоту в газах .....	1.3 - 45
2.5.27.	Кисень у газах .....	1.3 - 46
2.5.28.	Вода в газах .....	1.3 - 46
2.5.29.	Діоксид сірки .....	1.3 - 46



2.5.30.	Окиснюючі речовини.....	1.3 - 47
2.5.31.	Рибоза в полісахаридних вакцинах .....	1.4 - 62
2.5.32.	Визначення води мікрометодом .....	1.2-107
2.5.33.	Загальний білок .....	1.4 - 62
2.5.34.	Оцтова кислота в синтетичних пептидах .....	1.4 - 67
2.5.35.	Закис азоту у газах .....	1.4 - 67
2.5.36.	Анізидинове число .....	1.4 - 68

## 2.6. *БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ*

2.6.1.	Стерильність.....	1.4 - 69
2.6.2.	Мікобактерії .....	1.4 - 74
2.6.8.	Пірогени .....	1.0-107
2.6.9.	Аномальна токсичність.....	1.4 - 74
2.6.10.	Гістамін .....	1.4 - 75
2.6.11.	Депресорні речовини .....	1.1 - 37
2.6.12.	Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів (визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів) .....	1.4 - 76
2.6.13.	Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів (випробування на окремі види мікроорганізмів) .....	1.4 - 84
2.6.14.	Бактеріальні ендотоксини .....	1.4 - 94
2.6.16.	Випробування на сторонні агенти у вірусних вакцинах для застосування людиною.....	1.4-100
2.6.18.	Випробування живих вірусних вакцин на нейровірулентність .....	1.4-102
2.6.19.	Випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної).....	1.4-103
2.6.21.	Методи ампліфікації нуклеїнових кислот.....	1.4-105
2.6.31.	Випробування мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів для орального застосування .....	1.4-111

## 2.7. *БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ*

2.7.1.	Імунохімічні методи .....	1.1 - 55
2.7.2.	Кількісне визначення антибіотиків мікробіологічним методом .....	1.4-116
2.7.5.	Кількісне визначення гепарину.....	1.4-127
2.7.6.	Кількісне визначення вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої).....	1.4-128
2.7.7.	Кількісне визначення вакцини для профілактики кашлюку (цільноклітинної).....	1.4-135
2.7.8.	Кількісне визначення вакцини для профілактики правцю (адсорбованої) .....	1.4-136
2.7.14.	Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту А.....	1.4-142
2.7.15.	Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК).....	1.4-142
2.7.24.	Проточна цитометрія .....	1.4-143
2.7.27.	Значення флокуляції (Lf) дифтерійного, протиправцевого токсинів та анатоксинів (кількісне визначення за Рамоном/проба Рамона) .....	1.4-146

## 2.8. *МЕТОДИ ФАРМАКОГНОЗІЇ*

2.8.1.	Зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті.....	1.2-126
2.8.2.	Сторонні домішки в лікарській рослинній сировині .....	1.1 - 59
2.8.3.	Продихи та продиховий індекс.....	1.2-126
2.8.4.	Показник набухання .....	1.2-126
2.8.5.	Вода в ефірних оліях.....	1.2-127
2.8.6.	Сторонні ефіри в ефірних оліях.....	1.2-127
2.8.7.	Жирні олії й осмолені ефірні олії в ефірних оліях .....	1.2-127
2.8.8.	Запах та смак ефірних олій.....	1.2-127
2.8.9.	Залишок після випарювання ефірних олій .....	1.2-127
2.8.10.	Розчинність ефірних олій у спирті .....	1.2-127
2.8.11.	Кількісне визначення 1,8-цинеолу в ефірних оліях.....	1.2-128
2.8.12.	Визначення вмісту ефірних олій у лікарських засобах рослинного походження .....	1.1 - 59
2.8.13.	Залишкові кількості пестицидів .....	1.1 - 60
2.8.14.	Визначення танінів у лікарських засобах рослинного походження .....	1.2-128

2.8.15.	Показник гіркоти .....	1.2 - 129
2.8.16.	Визначення сухого залишку екстрактів .....	1.1 - 63
2.8.17.	Визначення втрати в масі при висушуванні екстрактів.....	1.1 - 64
2.8.18.	Визначення афлатоксину В <sub>1</sub> у лікарській рослинній сировині.....	1.4 - 148
2.8.20.	Лікарська рослинна сировина: відбір проб і пробопідготовка.....	1.4 - 150
2.8.23.	Мікроскопічне дослідження лікарської рослинної сировини .....	1.4 - 151
<b>2.9. ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ</b>		
2.9.1.	Розпадання таблеток і капсул .....	1.2 - 131
2.9.2.	Розпадання супозиторіїв і песаріїв .....	1.0 - 151
2.9.3.	Тест «Розчинення» для твердих дозованих форм .....	1.2 - 134
2.9.4.	Тест «Розчинення» для трансдермальних пластирів .....	1.2 - 143
2.9.5.	Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу .....	1.1 - 70
2.9.6.	Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу.....	1.1 - 71
2.9.7.	Стираність таблеток без оболонки .....	1.2 - 146
2.9.8.	Стійкість таблеток до роздавлювання .....	1.0 - 161
2.9.9.	Вимірювання консистенції методом пенетрометрії.....	1.1 - 74
2.9.10.	Вміст етанолу й алкоголеметричні таблиці .....	1.1 - 76
2.9.11.	Визначення вмісту метанолу і 2-пропанолу .....	1.1 - 82
2.9.12.	Ситовий аналіз.....	1.0 - 162
2.9.13.	Визначення розміру часток порошків методом мікроскопії (вилучено) .....	1.0 - 162
2.9.14.	Визначення питомої площі поверхні методом проникності повітря .....	1.2 - 147
2.9.15.	Насипний об'єм (вилучено).....	1.0 - 162
2.9.16.	Плинність .....	1.0 - 163
2.9.17.	Об'єм лікарських засобів парентерального застосування, що витягається.....	1.2 - 149
2.9.18.	Лікарські засоби для інгаляції: аеродинамічне визначення дрібнодисперсних часток.....	1.2 - 150
2.9.19.	Механічні включення: невидимі частки .....	1.2 - 164
2.9.20.	Механічні включення: видимі частки .....	1.0 - 166
2.9.21.	Механічні включення: невидимі частки (вилучено, введено до статті 2.9.19) .....	1.0 - 166
2.9.22.	Визначення часу розм'якшення ліпофільних супозиторіїв.....	1.1 - 83
2.9.23.	Пікнометричне визначення густини твердих речовин.....	1.2 - 167
2.9.24.	Стійкість супозиторіїв і песаріїв до руйнування (вилучено).....	1.1 - 84
2.9.25.	Тест «Розчинення» для гумок жувальних медичних.....	1.2 - 168
2.9.26.	Визначення питомої площі поверхні адсорбцією газу.....	1.2 - 170
2.9.27.	Однорідність маси доз, що витягаються із багатодозових контейнерів.....	1.1 - 86
2.9.28.	Визначення маси або об'єму вмісту контейнера для рідких і м'яких лікарських форм (вилучено) .....	1.1 - 86
2.9.29.	Власне розчинення.....	1.2 - 174
2.9.31.	Визначення розміру частинок методом лазерної дифракції.....	1.3 - 48
2.9.33.	Характеризація кристалічних і частково кристалічних твердих речовин методом рентгенівської дифракції порошку (РДП).....	1.4 - 154
2.9.34.	Насипна густина та густина після усадки порошків .....	1.3 - 53
2.9.35.	Здрібненість порошків .....	1.3 - 56
2.9.36.	Плинність порошків.....	1.3 - 56
2.9.37.	Оптична мікроскопія .....	1.2 - 175
2.9.38.	Визначення гранулометричного складу аналітичним просіюванням .....	1.2 - 177
2.9.40.	Однорідність дозованих одиниць .....	1.3 - 60
2.9.41.	Крихкість гранул і сфероїдів.....	1.4 - 160
2.9.42.	Тест «Розчинення» для твердих ліпофільних дозованих форм .....	1.2 - 184
2.9.43.	Спостережуване розчинення .....	1.2 - 185
2.9.45.	Змочуваність пористих твердих речовин і порошків.....	1.4 - 162
<b>3. МАТЕРІАЛИ ТА КОНТЕЙНЕРИ</b>		
<b>3.1. МАТЕРІАЛИ, ВИКОРИСТОВУВАНІ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КОНТЕЙНЕРІВ</b>		
3.1.1.	Матеріали для контейнерів для людської крові та компонентів крові .....	1.1 - 87
3.1.1.1.	Матеріали на основі пластифікованого полівінілхлориду для контейнерів для людської крові та компонентів крові .....	1.1 - 87

3.1.1.2.	Матеріали на основі пластифікованого полівінілхлориду для трубок, використовуваних в комплектах для переливання крові та компонентів крові.....	1.1 - 91
3.1.3.	Поліолефіни .....	1.1 - 94
3.1.4.	Поліетилен без добавок для контейнерів для лікарських засобів для парентерального застосування і очних лікарських засобів.....	1.1 - 99
3.1.5.	Поліетилен з добавками для контейнерів для лікарських засобів для парентерального застосування і очних лікарських засобів.....	1.1 - 100
3.1.6.	Поліпропілен для контейнерів і закупорювальних засобів для лікарських засобів для парентерального застосування і очних лікарських засобів.....	1.1 - 105
3.1.7.	Поліетиленвінілацетат для контейнерів і трубок для лікарських засобів для загального парентерального живлення.....	1.1 - 109
3.1.8.	Силіконове масло, що використовується як змащувальна добавка .....	1.1 - 112
3.1.9.	Силіконові еластomers для закупорювальних засобів і трубок .....	1.1 - 113
3.1.10.	Матеріали на основі неластифікованого полівінілхлориду для контейнерів для неін'єкційних водних розчинів.....	1.1 - 114
3.1.11.	Матеріали на основі неластифікованого полівінілхлориду для контейнерів для твердих лікарських форм для орального застосування .....	1.1 - 117
3.1.13.	Добавки до пластмаси .....	1.1 - 120
3.1.14.	Матеріали на основі пластифікованого полівінілхлориду для контейнерів для водних розчинів для внутрішньовенного введення.....	1.1 - 123
3.1.15.	Поліетилентерефталат для контейнерів для лікарських засобів непарентерального застосування .....	1.1 - 126

## 3.2. КОНТЕЙНЕРИ

3.2.1.	Скляні контейнери для фармацевтичного застосування .....	1.1 - 129
3.2.2.	Пластмасові контейнери і закупорювальні засоби для фармацевтичного застосування .....	1.1 - 133
3.2.2.1.	Пластмасові контейнери для водних розчинів для парентерального застосування.....	1.1 - 134
3.2.3.	Стерильні пластмасові контейнери для людської крові та компонентів крові .....	1.1 - 135
3.2.4.	Порожні стерильні контейнери з пластифікованого полівінілхлориду для людської крові та компонентів крові.....	1.1 - 138
3.2.5.	Стерильні контейнери з пластифікованого полівінілхлориду для людської крові, що містять розчин антикоагулянта .....	1.1 - 139
3.2.6.	Комплекти для переливання крові та компонентів крові .....	1.1 - 139
3.2.8.	Стерильні одноразові пластмасові шприци .....	1.1 - 141
3.2.9.	Гумові закупорювальні засоби для контейнерів з водними лікарськими засобами для парентерального застосування, для порошків і ліофілізованих порошків .....	1.1 - 143

4.	РЕАКТИВИ .....	1.0 - 169, 1.1 - 4, 1.2 - 23, 1.3 - 19, 1.4 - 28
----	----------------	--

## 5. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ

### 5.1. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ З МІКРОБІОЛОГІЇ

5.1.1.	Методи приготування стерильних продуктів.....	1.0 - 297
5.1.2.	Біологічні індикатори стерилізації .....	1.0 - 299
5.1.3.	Ефективність антимікробних консервантів.....	1.4 - 169
5.1.4.	Мікробіологічна чистота лікарських засобів .....	1.4 - 171
5.1.5.	Застосування концепції $F_0$ при паровій стерилізації водних лікарських засобів.....	1.4 - 172
5.1.7.	Вірусна безпека .....	1.2 - 189
5.1.8.	Мікробіологічна чистота рослинних лікарських засобів для орального застосування .....	1.4 - 173
5.1.9.	Рекомендації щодо застосування випробування на стерильність .....	1.4 - 174
5.1.10.	Рекомендації щодо застосування випробування на бактеріальні ендотоксини .....	1.4 - 174

5.2.	<i>ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ НА БІОЛОГІЧНІ ПРОДУКТИ</i>	
5.2.1.	Термінологія, яку використовують в монографіях на біологічні продукти .....	1.2 - 190
5.2.2.	Курячі зграї, вільні від специфічних патогенів, для виробництва та контролю якості вакцин.....	1.4 - 180
5.2.3.	Клітинні субстрати для виробництва вакцин для застосування людиною .....	1.4 - 183
5.2.4.	Культури клітин для виробництва вакцин для застосування у ветеринарії .....	1.4 - 187
5.2.5.	Субстанції тваринного походження для виробництва імунологічних лікарських засобів для застосування у ветеринарії .....	1.4 - 190
5.2.6.	Визначення безпеки вакцин та імуносироваток для застосування у ветеринарії .....	1.4 - 192
5.2.7.	Визначення ефективності вакцин та імуносироваток для застосування у ветеринарії.....	1.4 - 194
5.2.8.	Мінімізація ризику передачі збудників губчастої енцефалопатії тварин через лікарські засоби для застосування людиною і у ветеринарії.....	1.3 - 67
5.2.9.	Визначення безпеки кожної партії вакцин імуносироваток для застосування у ветеринарії .....	1.4 - 195
5.3.	<i>СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ І КІЛЬКІСНИХ ВИЗНАЧЕНЬ</i> .....	1.1 - 151
5.3.N.	<i>СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ХІМІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ</i> .....	1.1 - 187
5.4.	<i>ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ</i> .....	1.1 - 215
5.5.	<i>АЛКОГОЛЕМЕТРИЧНІ ТАБЛИЦІ</i> .....	1.1 - 227
5.6.	<i>КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ</i> .....	1.4 - 198
5.7.	<i>ТАБЛИЦЯ ФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАДІОНУКЛІДІВ, НАВЕДЕНИХ У ФАРМАКОПЕЇ</i> .....	1.2 - 192
5.9.	<i>ПОЛІМОРФІЗМ</i> .....	1.2 - 199
5.10.	<i>КОНТРОЛЬ ДОМІШОК У СУБСТАНЦІЯХ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ</i> .....	1.2 - 200
5.11.	<i>РОЗДІЛ «ВЛАСТИВОСТІ» У МОНОГРАФІЯХ</i> .....	1.2 - 205
5.12.	<i>СТАНДАРТНІ ЗРАЗКИ</i> .....	1.3 - 79
5.14.	<i>ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, ПЕРЕНОСНИКИ ГЕНІВ, ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ</i> .....	1.4 - 202
5.N.1.	<i>ЕКСТЕМПОРАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ</i> .....	1.2 - 206
5.N.1.1.	Екстемпоральні нестерильні лікарські засоби .....	1.2 - 206
5.N.1.1.1.	Терміни й умови зберігання екстемпоральних нестерильних лікарських засобів .....	1.2 - 212
5.N.1.1.2.	Дані для розрахунків при приготуванні 1 л концентрованого розчину в масооб'ємній концентрації .....	1.2 - 215
5.N.1.1.3.	Коефіцієнти збільшення об'єму водного розчину при розчиненні лікарських речовин .....	1.2 - 216
5.N.1.2.	Вищі разові та добові дози отруйних та сильнодіючих лікарських засобів для дорослих .....	1.2 - 218
5.N.1.3.	Вищі разові та добові дози отруйних та сильнодіючих лікарських засобів для дітей .....	1.2 - 228
5.N.1.4.	Порошки екстемпоральні .....	1.4 - 221
5.N.2.	<i>ДОСЛІДЖЕННЯ БІОДОСТУПНОСТІ ТА БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ГЕНЕРИЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ</i> .....	1.2 - 231

**ЗАГАЛЬНІ МОНОГРАФІЇ**

Алергенні продукти .....	1.2 -257
Вакцини для застосування людиною .....	1.3 - 87
Вакцини для застосування у ветеринарії .....	1.3 - 91
Екстракти .....	1.3 - 98
Ефірні олії .....	1.2 -263
Імуносироватка для застосування у ветеринарії .....	1.3 -102
Імуносироватка тварин для застосування людиною .....	1.2 -265
Лікарські рослинні засоби .....	1.2 -268
Лікарська рослинна сировина .....	1.4 -225
Лікарські рослинні чаї .....	1.2 -270
Моноклональні антитіла для застосування людиною .....	1.3 -107
Продукти, одержувані за допомогою технології рекомбінантної ДНК .....	1.2 -271
Продукти ферментації .....	1.1 -274
Радіофармацевтичні лікарські засоби .....	1.2 -274
Рослинні жирні олії .....	1.2 -282
Субстанції для фармацевтичного застосування .....	1.3 -111

**ЗАГАЛЬНІ СТАТТІ НА ЛІКАРСЬКІ ФОРМИ**

Ветеринарні рідкі лікарські засоби для зовнішнього застосування .....	1.3 -121
Внутрішньматкові лікарські засоби для застосування у ветеринарії .....	1.3 -122
Внутрішньорубцеві засоби .....	1.3 -124
Інтрамарні лікарські засоби для застосування у ветеринарії .....	1.3 -125
Вушні лікарські засоби .....	1.2 -287
Гранули .....	1.2 -289
Гумки жувальні медичні .....	1.2 -291
Капсули .....	1.2 -291
Лікарські засоби для вагінального застосування .....	1.2 -294
Лікарські засоби для зрошення .....	1.2 -297
Лікарські засоби для інгаляції .....	1.2 -298
Лікарські засоби для парентерального застосування .....	1.2 -303
Лікарські засоби для ректального застосування .....	1.2 -308
Лікарські засоби, що знаходяться під тиском .....	1.2 -311
М'які лікарські засоби для зовнішнього застосування .....	1.3 -126
Назальні лікарські засоби .....	1.2 -315
Настойки ( <i>вилучено, введено до загальної монографії «Екстракти»</i> ) .....	1.1 -269
Оромукосні лікарські засоби .....	1.2 -318
Очні лікарські засоби .....	1.2 -322
Палички .....	1.2 -326
Піни медичні .....	1.0 -518
Пластири трансдермальні .....	1.2 -327
Порошки для зовнішнього застосування .....	1.3 -130
Порошки для орального застосування .....	1.2 -329
Премікси лікувальних кормових добавок для застосування у ветеринарії .....	1.3 -131
Продукти з ризиком передачі збудників губчастої енцефалопатії тварин .....	1.3 -132
Рідкі лікарські засоби для зовнішнього застосування .....	1.2 -330
Рідкі лікарські засоби для орального застосування .....	1.2 -331
Таблетки .....	1.2 -335
Тампони медичні .....	1.2 -340

**МОНОГРАФІЇ НА ВАКЦИНИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ**

Вакцина BCG, ліофілізована .....	1.3 -135
Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована, адсорбована) .....	1.4 -229
Вакцина для профілактики гепатиту В (рДНК) .....	1.4 -231
Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована) .....	1.4 -233
Вакцина для профілактики гепатиту А (інактивована) та гепатиту В (рДНК) (адсорбована) .....	1.4 -233
Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована) .....	1.4 -234

Вакцина для профілактики дифтерії (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена) .....	1.4-236
Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована) .....	1.4-238
Вакцина для профілактики дифтерії та правця (адсорбована, зі зменшеним вмістом антигена (-ів)) .....	1.4-239
Вакцина для профілактики дифтерії, правця та кашлюку (цільноклітинна) (адсорбована) .....	1.4-241
Вакцина для профілактики інфекцій, викликаних <i>Haemophilus Influenzae</i> типу b (кон'югована) .....	1.4-243
Вакцина для профілактики кашлюку (цільноклітинна, адсорбована) .....	1.4-247
Вакцина для профілактики кору (жива) .....	1.4-249
Вакцина для профілактики кору, паротиту та краснухи (жива) .....	1.4-252
Вакцина для профілактики краснухи (жива) .....	1.4-253
Вакцина для профілактики паротиту (жива) .....	1.4-256
Вакцина для профілактики поліомієліту (інактивована) .....	1.4-258
Вакцина для профілактики поліомієліту (оральна) .....	1.4-262
Вакцина для профілактики правця (адсорбована) .....	1.4-269

### МОНОГРАФІЇ НА ІМУНОСИРОВАТКИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДИНОЮ

Імуносироватка проти отрути гадюки європейської .....	1.4-275
Сироватка протиботулінічна .....	1.4-276
Сироватка протигангренозна (novi) .....	1.4-277
Сироватка протигангренозна (perfringens) .....	1.4-278
Сироватка протигангренозна (septicum) .....	1.4-279
Сироватка протигангренозна, змішана .....	1.4-280
Сироватка протидифтерійна .....	1.4-281
Сироватка протиправцева .....	1.4-282

### МОНОГРАФІЇ НА ЛІКАРЬСКУ РОСЛИННУ СИРОВИНУ

Алтеї корені .....	1.2-346
Алтеї листя .....	1.2-347
Алтеї трава <sup>N</sup> .....	1.2-348
Анісова олія .....	1.2-360
Арніки квітки .....	1.4-287
Арніки настойка .....	1.4-289
Артишоку листя .....	1.4-291
Беладонни листя настойка стандартизована .....	1.4-293
Беладонни листя .....	1.3-157
Берези листя .....	1.4-295
Бобівника трилистого листя .....	1.2-373
Бузини квітки .....	1.2-377
Бурі водорості .....	1.3-159
Буркун .....	1.4-296
Валеріани корені .....	1.2-383
Вербени трава .....	1.4-299
Вітекса священного плоди .....	1.4-301
Вовчуга корені .....	1.2-385
Гамамелісу листя .....	1.4-303
Гвоздика .....	1.2-397
Гвоздична олія .....	1.2-398
Гібіскус .....	1.2-407
Гідрастису канадського кореневища .....	1.4-304
Гінкго листя .....	1.2-408
Глоду листя та квітки .....	1.3-163
Глоду плоди .....	1.2-414
Деревій .....	1.2-421
Дуба кора .....	1.4-306
Дурману листя .....	1.4-307
Евкالیпта листя .....	1.2-433

Евкалиптова олія .....	1.2 -434
Ехінацеї білої корені .....	1.3 -173
Ехінацеї вузьколистої корені .....	1.3 -175
Ехінацеї пурпурової корені .....	1.3 -177
Ехінацеї пурпурової корені <sup>N</sup> .....	1.3 -182
Ехінацеї пурпурової настойка <sup>N</sup> .....	1.3 -184
Ехінацеї пурпурової трава .....	1.2 -443
Звіробій .....	1.4 -310
Зірчастий аніс .....	1.4 -311
Імбир .....	1.3 -187
Касії вузьколистої плоди .....	1.3 -188
Касії гостролистої плоди .....	1.3 -190
Касії листя .....	1.4 -313
Каскара .....	1.4 -315
Кола .....	1.2 -471
Кориці китайської олія .....	1.2 -472
Кориці цейлонської кори олія .....	1.2 -473
Кориці цейлонської листя олія .....	1.4 -316
Коричник .....	1.4 -318
Коричника настойка .....	1.4 -318
Коріандр .....	1.3 -191
Кропиви листя .....	1.4 -320
Крушини кора .....	1.4 -322
Куркума яванська .....	1.2 -481
Лавандова олія .....	1.4 -323
Ламінарії слані <sup>N</sup> .....	1.2 -489
Лимонна олія .....	1.2 -490
Липи квітки .....	1.3 -195
Материнка .....	1.4 -324
Материнки трава <sup>N</sup> .....	1.4 -325
Мирра .....	1.4 -326
Мирри настойка .....	1.4 -327
Мучниці листя .....	1.3 -198
М'яти листя .....	1.4 -329
Нагідок квітки .....	1.4 -332
Нагідок настойка <sup>N</sup> .....	1.4 -333
Наперстянки листя .....	1.2 -525
Пасифлора .....	1.4 -334
Перстач прямостоячий .....	1.4 -336
Перстачу прямостоячого настойка .....	1.3 -204
Подорожник ланцетолистий .....	1.4 -337
Подорожника великого листя <sup>N</sup> .....	1.4 -339
Полин гіркий .....	1.4 -341
Померанцю гіркого екзокарпій і мезокарпій .....	1.4 -342
Приворотень .....	1.4 -343
Ратанії корені .....	1.4 -344
Ратанії настойка .....	1.4 -345
Римської ромашки квітки .....	1.2 -539
Розмаринова олія .....	1.4 -346
Розторопші плоди .....	1.3 -207
Ромашки квітки .....	1.4 -349
Рускус шипуватий .....	1.2 -544
Собача кропива .....	1.3 -211
Собачої кропиви настойка <sup>N</sup> .....	1.2 -548
Солодки корені .....	1.3 -212
Спориш .....	1.4 -351
Стручковий перець .....	1.4 -352
Стручкового перцю настойка .....	1.4 -354
Тирлича корені .....	1.4 -355
Тирлича настойка .....	1.3 -215
Хвоща стебла .....	

Хінного дерева кора.....	1.4 -356
Хмелю шишки.....	1.3 -216
Центела.....	1.4 -358
Цитронелова олія.....	1.4 -359
Чайного дерева олія.....	1.2 -591
Чебрець повзучий.....	1.3 -233
Чебрець.....	1.3 -231
Чистотіл.....	1.2 -592
Шавлії листя ( <i>salvia officinalis</i> ).....	1.4 -360
Шавлії настоянка.....	1.4 -361

### ГОМЕОПАТИЧНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

Гомеопатичні лікарські засоби.....	1.1 -491
Лікарська рослинна сировина для гомеопатичних лікарських засобів.....	1.3 -141
Матричні настойки для гомеопатичних лікарських засобів.....	1.1 -493
Методи приготування гомеопатичних базисних препаратів і потенціювання.....	1.3 -142

### МОНОГРАФІЇ

Адреналіну тартрат.....	1.1 -283
Азитроміцин.....	1.2 -343
Аланін.....	1.0 -313
Амброксолу гідрохлорид.....	1.2 -350
Аміаку розчин концентрований.....	1.0 -314
Амітриптиліну гідрохлорид.....	1.4 -365
Амоксицилін натрію.....	1.4 -367
Амоксицилін тригідрат.....	1.2 -354
Амонію хлорид.....	1.1 -284
Ампіцилін безводний.....	1.4 -370
Ампіцилін натрію.....	1.4 -373
Ампіцилін тригідрат.....	1.2 -357
Арахісова олія гідрогенізована.....	1.2 -362
Арахісова олія рафінована.....	1.2 -363
Аргінін.....	1.0 -319
Аргініну гідрохлорид.....	1.0 -320
Артикаїну гідрохлорид.....	1.2 -364
Атенолол.....	1.4 -377
Атропіну сульфат.....	1.0 -323
Ацетилцестеїн.....	1.0 -325
Ацетон.....	1.2 -366
Ацикловір.....	1.1 -290
Бавовняна олія гідрогенізована.....	1.2 -369
Барію сульфат.....	1.2 -370
Бензилбензоат.....	1.2 -371
Бензилпеніциліну калієва сіль.....	1.0 -329
Бензилпеніциліну натрієва сіль.....	1.1 -295
Бензокаїн.....	1.2 -372
Бетаметазону дипропіонат.....	1.1 -298
Бісакодил.....	1.0 -334
Бромгексину гідрохлорид.....	1.2 -375
Бупівакаїну гідрохлорид.....	1.1 -300
Бупренорфіну гідрохлорид.....	1.0 -336
Бура.....	1.2 -378
Бура.....	1.1 -302
Бугілгідрокситолуол.....	1.1 -303
Бугілгідроксіанізол.....	1.4 -381
Вазелін.....	1.2 -382
Вазелінове масло.....	1.0 -339
Валін.....	1.0 -340
Ванілін.....	1.0 -340
Верапамілу гідрохлорид.....	1.0 -342



Вода високоочищена .....	1.4 -382
Вода для ін'єкцій .....	1.4 -385
Вода очищена .....	1.4 -389
Водню пероксиду розчин (3 %) .....	1.1 -309
Водню пероксиду розчин (30 %) .....	1.1 -310
Вугілля активоване .....	1.3 -161
Галоперидол .....	1.0 -345
Гентаміцину сульфат .....	1.2 -399
Гепарин кальцію .....	1.4 -393
Гепарин натрію .....	1.4 -396
Гепарини низькомолекулярні .....	1.4 -399
Гідрокортизону ацетат .....	1.1 -313
Гістидин .....	1.0 -349
Гістидину гідрохлорид моногідрат .....	1.0 -351
Глібенкламід .....	1.1 -315
Гліцерин .....	1.2 -409
Гліцерин (85 %) .....	1.2 -412
Гліцерину тринітрату розчин .....	1.0 -357
Гліцин .....	1.1 -317
Глюкоза безводна .....	1.0 -360
Глюкоза моногідрат .....	1.2 -417
Декстран 40 для ін'єкцій .....	1.1 -321
Дигітоксин .....	1.1 -322
Дигоксин .....	1.1 -324
Дикалій фосфат .....	1.1 -326
Дилтіазему гідрохлорид .....	1.2 -423
Диметилсульфоксид .....	1.2 -425
Динатрію едетат .....	1.2 -426
Динатрію фосфат дигідрат .....	1.0 -364
Динатрію фосфат додекагідрат .....	1.0 -365
Дипіридамол .....	1.4 -403
Дисульфірам .....	1.0 -366
Дифенгідраміну гідрохлорид .....	1.2 -429
Діазепам .....	1.0 -363
Доксицикліну хілат .....	1.1 -329
Доксорубіцину гідрохлорид .....	1.1 -332
Допаміну гідрохлорид .....	1.0 -367
Еконазолу нітрат .....	1.0 -369
Еналаприлу малеат .....	1.2 -435
Еноксапарин натрію .....	1.2 -437
Ергокальциферол .....	1.1 -335
Ергометрину малеат .....	1.1 -337
Етамбутолу гідрохлорид .....	1.3 -171
Етамзилат .....	1.2 -440
Етанол (96 %) .....	1.1 -339
Етанол безводний .....	1.1 -343
Етилморфіну гідрохлорид .....	1.2 -441
Етилолеат .....	1.0 -371
Ефір для наркозу .....	1.1 -348
Заліза сульфат гептагідрат .....	1.1 -351
Ібупрофен .....	1.1 -353
Ізолейцин .....	1.1 -353
Ізоніазид .....	1.0 -373
Ізоніазид .....	1.2 -447
Ізопропілміристат .....	1.2 -448
Ізосорбїду динітрат розведений .....	1.2 -448
Ізосорбїду динітрат розведений .....	1.0 -374
Індометацин .....	1.2 -449
Інсулін аспартат .....	1.4 -405
Інсулін бичачий .....	1.4 -408
Інсулін двофазовий для ін'єкцій .....	1.4 -408
Інсулін двофазовий для ін'єкцій .....	1.4 -411
Інсулін ізофановий двофазовий для ін'єкцій .....	1.4 -411

Інсулін ізофановий для ін'єкцій.....	1.4-412
Інсулін лізпро.....	1.4-412
Інсулін людський.....	1.4-416
Інсулін розчинний для ін'єкцій.....	1.4-419
Інсулін свинячий.....	1.4-420
Інсуліну лікарські засоби для ін'єкцій.....	1.4-423
Інсуліну цинкова суспензія (аморфна) для ін'єкцій.....	1.4-427
Інсуліну цинкова суспензія (кристалічна) для ін'єкцій.....	1.4-427
Інсуліну цинкова суспензія для ін'єкцій.....	1.4-428
Інтерферону альфа-2 розчин концентрований.....	1.4-429
Інтерферону бета-1a розчин концентрований.....	1.4-433
Інтерферону гамма-1b розчин концентрований.....	1.4-436
Йод.....	1.1-357
Калію ацетат.....	1.1-359
Калію бромід.....	1.1-360
Калію гідроксид.....	1.1-361
Калію дигідрофосфат.....	1.1-362
Калію йодид.....	1.1-363
Калію перманганат.....	1.1-364
Калію хлорид.....	1.1-365
Калію цитрат.....	1.1-366
Кальцію гліцерофосфат.....	1.2-451
Кальцію глюконат.....	1.0-379
Кальцію глюконат для ін'єкцій.....	1.2-452
Кальцію карбонат.....	1.1-367
Кальцію лактат пентагідрат.....	1.1-368
Кальцію хлорид гексагідрат.....	1.1-369
Кальцію хлорид дигідрат.....	1.1-370
Камфора рацемічна.....	1.0-382
Канаміцину моносульфат.....	1.0-383
Каптоприл.....	1.4-443
Карбамазепін.....	1.2-454
Кетаміну гідрохлорид.....	1.0-386
Кетопрофен.....	1.2-456
Кетотифену гідрофумарат.....	1.2-458
Кислота аскорбінова.....	1.0-388
Кислота аспарагінова.....	1.0-389
Кислота ацетилсаліцилова.....	1.0-391
Кислота бензойна.....	1.1-371
Кислота борна.....	1.0-392
Кислота винна.....	1.1-372
Кислота глутамінова.....	1.0-393
Кислота лимонна безводна.....	1.2-460
Кислота лимонна моногідрат.....	1.2-462
Кислота малеїнова.....	1.1-374
Кислота нікотинова.....	1.0-396
Кислота олеїнова.....	1.2-463
Кислота саліцилова.....	1.2-464
Кислота сорбінова.....	1.0-397
Кислота фоліева.....	1.1-376
Кислота фосфорна концентрована.....	1.1-378
Кислота фосфорна розведена.....	1.1-378
Кислота хлористоводнева концентрована.....	1.1-379
Клонідину гідрохлорид.....	1.4-446
Клопідогрелю гідросульфат <sup>N</sup> .....	1.2-465
Кодеїн.....	1.2-468
Кокосова олія рафінована.....	1.2-470
Кофеїн.....	1.2-474
Кофеїн моногідрат.....	1.2-476
Кунжутна олія рафінована.....	1.2-477

Лактоза безводна .....	1.2 -483
Лактоза моногідрат .....	1.2 -485
Лактоза дінагідрат .....	1.2 -487
Леводопа .....	1.1 -383
Левоментол .....	1.1 -385
Левотироксину натрієва сіль .....	1.0 -403
Лейцин .....	1.4 -449
Лідокаїну гідрохлорид .....	1.0 -404
Лізину гідрохлорид .....	1.0 -406
Лінкоміцину гідрохлорид .....	1.1 -387
Ліотироніну натрієва сіль .....	1.2 -493
Лопераміду гідрохлорид .....	1.1 -389
Магнію карбонат важкий .....	1.1 -390
Магнію карбонат легкий .....	1.0 -409
Магнію оксид важкий .....	1.0 -410
Магнію оксид легкий .....	1.1 -391
Магнію сульфат гептагідрат .....	1.1 -391
Магнію хлорид гексагідрат .....	1.1 -393
Макроголи .....	1.2 -497
Малгітол .....	1.2 -499
Маніт .....	1.2 -501
Маслинова олія нерафінована .....	1.2 -502
Маслинова олія рафінована .....	1.1 -395
Ментол рацемічний .....	1.1 -397
Меркаптопурин .....	1.1 -398
Метамізолу натрієва сіль .....	1.0 -411
Метилпарагідроксибензоат .....	1.2 -504
Метилсаліцилат .....	1.1 -400
Метилцелюлоза .....	1.0 -412
Метіонін .....	1.2 -505
Метоклопраміду гідрохлорид .....	1.2 -506
Метронідазол .....	1.2 -507
Мигдальна олія нерафінована .....	1.2 -508
Мигдальна олія рафінована .....	1.1 -401
Міді сульфат безводний .....	1.1 -402
Міді сульфат пентагідрат .....	1.1 -402
Міконазолу нітрат .....	1.0 -415
Налоксону гідрохлорид дигідрат .....	1.0 -417
Напроксен .....	1.1 -405
Натрію амідотризоат .....	1.1 -406
Натрію ацетат тригідрат .....	1.1 -407
Натрію бензоат .....	1.1 -409
Натрію бромід .....	1.1 -410
Натрію гідрокарбонат .....	1.1 -411
Натрію гідроксид .....	1.0 -418
Натрію дигідрофосфат дигідрат .....	1.0 -419
Натрію диклофенак .....	1.1 -412
Натрію йодид .....	1.1 -413
Натрію карбонат безводний .....	1.1 -414
Натрію карбонат декагідрат .....	1.1 -415
Натрію карбонат моногідрат .....	1.1 -415
Натрію лаурилсульфат .....	1.0 -420
Натрію метабісульфіт .....	1.1 -416
Натрію саліцилат .....	1.1 -417
Натрію сульфат безводний .....	1.1 -418
Натрію сульфат декагідрат .....	1.1 -419
Натрію сульфат гептагідрат .....	1.1 -420
Натрію тетраборат .....	1.0 -421
Натрію тіосульфат .....	1.1 -421

Натрію фторид.....	1.0 -422
Натрію хлорид.....	1.1 -422
Натрію цетостеарилсульфат.....	1.1 -424
Натрію цитрат.....	1.0 -423
Нікотинамід.....	1.0 -424
Ністатин.....	1.2 -513
Нітразепам.....	1.0 -425
Нітрофурал.....	1.0 -426
Ніфедипін.....	1.2 -514
Оксазепам.....	1.2 -517
Окситетрацикліну гідрохлорид.....	1.2 -519
Омепразол.....	1.1 -427
Орнітину гідрохлорид <sup>N</sup> .....	1.0 -430
Папаверину гідрохлорид.....	1.2 -523
Парацетамол.....	1.1 -432
Пентоксифілін.....	1.0 -433
Піперазину адипінат.....	1.0 -434
Піразинамід.....	1.3 -101
Пірацетам.....	1.2 -526
Піридоксину гідрохлорид.....	1.0 -435
Піроксикам.....	1.2 -528
Повідон.....	1.1 -436
Повідон-йод.....	1.1 -439
Повітря медичне.....	1.4 -453
Полісорбат 20.....	1.2 -529
Преднізолон.....	1.2 -531
Преднізолон натрію фосфат.....	1.2 -532
Прокаїнамід, гідрохлорид.....	1.0 -437
Прокаїну гідрохлорид.....	1.0 -438
Пролін.....	1.0 -439
Прометазину гідрохлорид.....	1.0 -441
Пропіленгліколь.....	1.1 -441
Пропілпарагідроксибензоат.....	1.0 -442
Пшениці зародків олія нерафінована.....	1.2 -534
Пшениці зародків олія рафінована.....	1.2 -535
Ранітидину гідрохлорид.....	1.2 -537
Резорцин.....	1.0 -445
Рибофлавін.....	1.1 -445
Рифампіцин.....	1.1 -446
Ртуті хлорид.....	1.1 -448
Серин.....	1.0 -449
Сечовина.....	1.2 -543
Сірка для зовнішнього застосування.....	1.1 -450
Соева олія гідрогенізована.....	1.2 -546
Соева олія рафінована.....	1.2 -547
Спирт бензиловий.....	1.1 -451
Спирт ізопропіловий.....	1.0 -450
Срібла нітрат.....	1.1 -453
Стрептоміцину сульфат.....	1.1 -453
Сульфаметоксазол.....	1.1 -456
Сульфаніламід.....	1.2 -550
Сульфацетамід натрію.....	1.2 -551
Тальк.....	1.2 -553
Твердий жир.....	1.0 -453
Теобромін.....	1.2 -555
Теобромін.....	1.2 -555
Теофілін-етилендіамін.....	1.2 -556
Теофілін моногідрат.....	1.2 -557
Тестостерону пропіонат.....	1.2 -559
Тетрацикліну гідрохлорид.....	1.2 -559
Тимол.....	1.2 -561
Тимол.....	1.1 -459

Тирозин.....	1.0 -458
Титану діоксид.....	1.1 -460
Тіаміну гідробромід <sup>N</sup> .....	1.0 -454
Тіаміну гідрохлорид.....	1.0 -456
Тreonin.....	1.0 -459
Триметоприм.....	1.1 -463
Триптофан.....	1.1 -461
Трифторпіразину гідрохлорид.....	1.1 -466
Трометамол.....	1.2 -563
Убаїн.....	1.1 -469
Феназон.....	1.2 -565
Фенілаланін.....	1.0 -465
Фенілефрину гідрохлорид.....	1.2 -566
Феніраміну малеат.....	1.2 -568
Фенобарбітал.....	1.2 -569
Фенол.....	1.0 -466
Фентаніл.....	1.1 -471
Флуоксетину гідрохлорид.....	1.1 -472
Формальдегіду розчин (35 %).....	1.1 -474
Фруктоза.....	1.1 -475
Фталілесульфатіазол.....	1.2 -571
Фторурацил.....	1.0 -469
Фуросемід.....	1.0 -470
Хлорамін.....	1.0 -473
Хлорамфенікол.....	1.2 -573
Хлорамфенікол натрію сукцинат.....	1.4 -457
Хлорбутанол безводний.....	1.1 -477
Хлорбутанол гемігідрат.....	1.1 -478
Хлорпромазину гідрохлорид.....	1.0 -474
Цефадроксил.....	1.3 -219
Цефазолін натрію.....	1.2 -575
Цефаклор.....	1.3 -221
Цефалексин моногідрат.....	1.3 -223
Цефіксим.....	1.3 -225
Цефокситин натрію.....	1.3 -227
Цефотаксим натрію.....	1.2 -580
Цефрадин.....	1.4 -459
Цефтриаксон натрію.....	1.2 -583
Циклофосфамід.....	1.0 -481
Цинаризин.....	1.2 -585
Цинку оксид.....	1.1 -483
Цинку сульфат гептагідрат.....	1.1 -484
Цинку хлорид.....	1.1 -485
Ципрофлоксацину гідрохлорид.....	1.2 -585
Цистеїн <sup>N</sup> .....	1.0 -483
Ціанокобаламін.....	1.2 -589

## N МОНОГРАФІЇ НА ГОТОВІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

Анальгін розчин для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.3 -239
Амброксолу таблетки.....	1.4 -465
Амітриптиліну таблетки, вкриті оболонкою.....	1.4 -466
Амоксициліну капсули.....	1.4 -468
Амоксициліну порошок для ін'єкцій.....	1.4 -469
Амоксициліну порошок для оральної суспензії.....	1.4 -471
Амоксициліну таблетки.....	1.4 -472
Ампіциліну капсули.....	1.4 -473
Ампіциліну порошок для ін'єкцій.....	1.4 -474
Ампіциліну порошок для оральної суспензії.....	1.4 -476

Ампіциліну таблетки .....	1.4-477
Анальгіну таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-240
Ацикловіру таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-241
Борної кислоти розчин спиртовий <sup>N</sup> .....	1.2-597
Бромгексину таблетки .....	1.4-478
Глюкози розчин для ін'єкцій або інфузій <sup>N</sup> .....	1.3-242
Глюкози та натрію хлориду розчин для ін'єкцій або інфузій <sup>N</sup> .....	1.3-243
Декстрану 40 та натрію хлориду розчин для інфузій <sup>N</sup> .....	1.3-244
Дипіридамолу таблетки, вкриті оболонкою .....	1.4-480
Етамбутолу таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-246
Ібупрофену таблетки, вкриті оболонкою .....	1.4-481
Ізоніазиду таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-247
Йоду розчин спиртовий <sup>N</sup> .....	1.2-597
Кальцію глюконату таблетки .....	1.4-483
Камфорний спирт <sup>N</sup> .....	1.3-248
Каптоприлу таблетки .....	1.4-484
Карбамазепіну таблетки .....	1.4-485
Кислоти аскорбінової розчин для ін'єкцій, 50 мг/мл .....	1.4-487
Кислоти аскорбінової таблетки .....	1.4-488
Кислоти ацетилсаліцилової таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-250
Клопідогрелю таблетки <sup>N</sup> .....	1.4-488
Лідокаїну розчин для ін'єкцій .....	1.4-491
Метронідазолу гель .....	1.4-492
Метронідазолу капсули .....	1.4-493
Метронідазолу песарії .....	1.4-494
Метронідазолу розчин для інфузій .....	1.4-495
Метронідазолу таблетки .....	1.4-496
Напроксену таблетки .....	1.4-498
Натрію хлориду розчин для ін'єкцій або інфузій, 9 мг/мл <sup>N</sup> .....	1.3-251
Ністатину мазь .....	1.4-499
Ністатину таблетки, вкриті оболонкою .....	1.4-499
Оксазепаму таблетки .....	1.4-500
Парацетамолу капсули .....	1.4-501
Парацетамолу таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-251
Піразинаміду таблетки .....	1.4-503
Піразинаміду таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-253
Ранітидину таблетки, вкриті оболонкою .....	1.4-504
Ранітидину розчин для ін'єкцій .....	1.4-505
Рифампіцину капсули <sup>N</sup> .....	1.3-254
Саліцилової кислоти розчин спиртовий <sup>N</sup> .....	1.2-601
Стрептоміцину порошок для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.3-255
Флуоксетину капсули .....	1.4-507
Хлорамфеніколу капсули .....	1.4-508
Хлорамфеніколу краплі вушні, розчин .....	1.4-512
Хлорамфеніколу краплі очні, розчин .....	1.4-511
Хлорамфеніколу крем .....	1.4-514
Хлорамфеніколу мазь очна .....	1.4-513
Хлорамфеніколу натрію сукцинату порошок для ін'єкцій .....	1.4-515
Хлорамфеніколу порошок для крапель очних .....	1.4-513
Хлорамфеніколу таблетки .....	1.4-509
Хлорпромазину таблетки, вкриті оболонкою .....	1.4-516
Цефадроксилу капсули <sup>N</sup> .....	1.3-256
Цефадроксилу порошок для оральної суспензії <sup>N</sup> .....	1.3-257
Цефазолін натрію для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.2-602
Цефаклору капсули <sup>N</sup> .....	1.3-258
Цефаклору порошок для оральної суспензії <sup>N</sup> .....	1.3-259
Цефалексину капсули <sup>N</sup> .....	1.3-260
Цефалексину порошок для оральної суспензії <sup>N</sup> .....	1.3-261
Цефалексину таблетки <sup>N</sup> .....	1.3-262
Цефіксиму порошок для оральної суспензії <sup>N</sup> .....	1.3-263

**Загальний зміст Державної Фармакопеї України 1-го видання**

---

Цефіксиму таблетки <sup>N</sup> .....	1.3 -264
Цефокситину порошок для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.3 -265
Цефотаксим натрію для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.2 -602
Цефтриаксон натрію для ін'єкцій <sup>N</sup> .....	1.2 -603
Ципрофлоксацину таблетки .....	1.4 -517

# Державна Фармакопея України

1-е видання

Доповнення 4



Державним підприємством «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Підписано до друку 15.03.2011 року. Формат 60×84/8.

Папір офсетний. Гарн. Ньютон. Друк офсетний.

Ум. друк. арк. 68

Тираж 500 прим.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

(свідоцтво про внесення до державного реєстру видавців серія ДК № 3604 від 15.10.2009)

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33

Друк ФОП Разладов І.Г.

Вул. Сумська, 73/75, к.46, м.Харків, 61023, Україна.

Свідоцтво Серія В03 №214181 від 01.07.2008р.